

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 1 em Toxicodependentes: Caracterização Molecular de Casos de Infecções VIH-1 Recentes vs Casos de Infecções VIH-1 Antigas

Ana Filipa Correia Silva

Mestrado em Microbiologia Clínica (3^a Edição)

2005-2007

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela
comissão Coordenadora do Conselho Científico da
Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 18 de
Março de 2008**

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



**Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 1 em
Toxicodependentes: Caracterização Molecular de Casos de Infecções VIH-1
Recentes vs Casos de Infecções VIH-1 Antigas**

Ana Filipa Correia Silva

Mestrado em Microbiologia Clínica (3ª Edição)

Dissertação Orientada pela Prof. Doutora Elizabeth Pádua
e Co-Orientada pelo Prof. Doutor Pedro Simas

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da
exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer
responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos
conteúdos nela apresentados.**

Ao Ricardo Mota

Resumo

O presente estudo baseou-se numa população toxicodependente com comportamentos de risco, residente em Lisboa, para avaliar a evolução da diversidade do VIH-1 ao longo do tempo. Os casos foram separados em dois grupos distintos com base na data de aquisição da infecção VIH: Infecções VIH-1 Antigas (entre 1994 e 1998) e Infecções VIH-1 Recentes (entre 2004 e 2006). Nos dois grupos verificou-se que a maioria dos indivíduos era natural de Portugal e que as deslocações se deram principalmente dentro da Europa.

A diversidade genética foi estudada com base em dois genes, *gag* e *env*. Constatou-se que, no grupo Infecções VIH-1 Antigas, o subtipo B tinha uma prevalência de 60%, enquanto que o subtipo G e as formas recombinantes apresentaram-se numa proporção de 20% cada. Entre estas últimas o subtipo B esteve sempre associado aos eventos de recombinação, resultando em 3 mosaicos genómicos BG, 1 BF e 1 recombinante entre a CRF14_BG e B, sem paralelo nas CRFs descritas. No grupo Infecções VIH-1 Recentes ocorreu uma evolução na diversidade genética do VIH-1, estando a presença de formas genéticas não B associado a este grupo ($p=0,003$). O subtipo B apresentou-se numa prevalência de apenas 15% em oposição às formas recombinantes, observadas em 45% dos casos. O subtipo G foi classificado em 20% dos casos e observou-se a presença do subtipo A, tanto na forma pura como recombinante. Entre as formas recombinantes foram identificados três genomas mosaico (CRF02/CRF14/A, ABJ e A1B) sem semelhanças com CRFs descritas.

Este estudo permitiu averiguar a existência de uma alteração, ao longo do tempo, do padrão molecular da infecção VIH/SIDA, com a introdução de novas formas virais na população toxicodependente, um grupo com grande impacto na epidemia VIH/SIDA devido a possuir um papel muito activo na disseminação da infecção para a população em geral.

Palavras chave: caracterização molecular, diversidade do VIH-1, variantes virais não B, *env*, *gag*, toxicodependentes, Portugal.

Abstract

To evaluate the diversity of HIV-1 along the time we have conducted our study in an IDU population with high risk behaviour, living in Lisbon. The selection was based on the acquisition date of HIV infection, dividing the population into two groups: HIV-1 Old Infections (between 1994 and 1998) and HIV-1 Recent Infections (between 2004 and 2006). Most of the individuals were born in Portugal and they have traveled mainly inside Europe.

In each group HIV was classified based on sequence analysis of *env* and *gag* genes. In HIV-1 Old Infections group subtype B was present in 60% of cases. Subtype G and recombinant genomes were each seen in 20% of cases. Subtype B had an active role in every recombinant event detected resulting in 3 BG, 1 BF and 1 mosaic pattern not yet described (CRF14_BG/B). In Recent HIV-1 Infections group the genetic diversity changed, showing a correlation between this group and the presence of non B strains ($p=0.003$). Indeed, subtype B has decreased in prevalence (15% of cases) but the recombinant forms increased their proportion to 45% of cases. Subtype G has maintained its number (20%) and subtype A has appeared for the first time in this population. Among the recombinant forms it was seen three new mosaic genomes (CRF02/CRF14/A, ABJ and A1B) with no parallel in the described CRFs.

These results clearly indicate that, in the IDU population studied, the HIV/AIDS molecular pattern has evolved with the introduction of new non B strains and appearance of new mosaic genomes. This population is of great interest due to their potential to propagate the HIV-1 infection to the general population, behaving like a bridge to dissemination of new viral forms.

Key words: molecular characterization, HIV-1 diversity, non B subtypes, *env*, *gag*, intravenous drug users, Portugal.

Índice Geral

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas	vii
I.Introdução	1
1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	2
1.1 Descoberta do Agente Infeccioso	2
1.2 Curso da Infecção por VIH-1	2
1.3 Vias de Transmissão	4
1.4 Panorama Actual da Infecção VIH/SIDA.....	5
2. Origem e Evolução do VIH-1.....	7
3. Classificação e Estrutura Morfológica do VIH-1.....	8
4. Organização do Genoma do VIH-1	9
5. Ciclo de Vida do VIH-1	11
5.1 Células Hospedeiras	11
5.2 Ciclo de replicação do VIH-1	12
6. Mecanismos para a Variabilidade Genética do VIH-1	14
7. Diversidade Genética do VIH-1	15
7.1 Grupos M, N e O	15
7.2 Formas Geneticamente Recombinadas	16
7.3 Classificação Molecular do grupo M	17
8. Distribuição de Subtipos e CRFs do VIH-1 no Mundo	18
9. Caracterização Molecular da Infecção VIH-1 no Continente Europeu	20
9.1 Infecção na Europa do Leste	21
9.2 Infecção na Europa Central.....	22
9.3 Infecção na Europa Ocidental	23
II.Fundamentação	26
III.Objectivos	28
IV.Desenvolvimento do Estudo	31
1. Descrição do Estudo	32
2. Critérios de Inclusão	32
3. Entidades Envolvidas	32
4. Aspectos Éticos.....	33
V.Material e Métodos	34
1. Caracterização da População Estudada	35
2. Colheita, Selecção e Preparação de Amostras	36
3. Amplificação das Regiões Genómicas Virais	37
3.1 Amplificação do Gene <i>env</i>	37

3.2 Amplificação do Gene <i>gag</i>	38
3.3 Visualização dos Produtos Finais.....	39
4. Purificação e Sequenciação dos Produtos Amplificados.....	39
5. Sequências <i>gag</i> e <i>env</i>	40
5.1 Análise por BLAST	40
5.2 Análise Filogenética	41
5.3 Análise por <i>bootscanning</i>	42
5.4 Sequências Referência	42
6. Tratamento Estatístico.....	43
VI.Resultados	44
1. Caracterização Epidemiológica do Grupo Infecções VIH-1 Antigas	45
2. Caracterização Epidemiológica do Grupo Infecções VIH-1 Recentes.....	47
3. Obtenção, Identificação e Submissão das Sequências TX.....	48
4. Estudo das Sequências TX	50
4.1 Classificação Molecular das Infecções VIH-1 Antigas.....	53
4.2 Classificação Molecular das Infecções VIH-1 Recentes	60
4.3 Relações Moleculares entre Infecções Antigas e Recentes.....	70
4.4 Comparação do Padrão Molecular da Infecção nos Grupos.....	76
VII.Discussão e Conclusão	77
1. Discussão.....	78
1.1 Grupo Infecções VIH-1 Antigas	79
1.2 Grupo Infecções VIH-1 Recentes	81
1.3 Evolução do Padrão Molecular da Infecção VIH-1	83
2. Conclusão e Perspectivas Futuras	84
Referências Bibliográficas	86
IX.Anexos	

Lista de Figuras

Figura 1	Gráfico representativo das três fases da infecção pelo VIH	3
Figura 2	Representação do número de pessoas infectadas pelo VIH no mundo.	6
Figura 3	Relação filogenética de ancestralidade entre os lentivírus de primatas (VIH e SIV) com base no gene <i>env</i>	8
Figura 4	Representação esquemática de um virião maduro de VIH-1	9
Figura 5	Representação esquemática do genoma proviral do VIH-1	11
Figura 6	Representação do ciclo de vida do VIH-1	14
Figura 7	Mapa mundo com a distribuição das formas genéticas do VIH-1	20
Figura 8	Gel de agarose dos produtos purificados amplificados a partir do gene <i>gag</i>	54
Figura 9	Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Antigas com base na região <i>gag</i>	55
Figura 10	Distribuição das sequências TX do grupo das Infecções VIH-1 Antigas consoante a sua classificação em <i>gag</i>	56
Figura 11	Análise por Bootscanning para identificação de pontos de recombinação intragénica em <i>gag</i> da sequência TX12	58
Figura 12	Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Antigas com base no gene <i>env</i>	59
Figura 13	Distribuição das sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Antigas, consoante a sua classificação em <i>env</i> .	62
Figura 14	Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Recentes com base na região <i>gag</i>	63
Figura 15	Distribuição das sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Recentes, consoante a classificação em <i>gag</i>	65
Figura 16	Análise por bootscanning para identificação de eventos de recombinação intragénica em <i>gag</i> de TX51	66
Figura 17	Análise por bootscanning para identificação de eventos de recombinação intragénica em <i>gag</i> de TX15	67
Figura 18	Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Recentes com base no gene <i>env</i>	68
Figura 19	Análise filogenética das 46 sequências TX _{gag} pertencentes ao grupo de Infecções VIH-1 Antigas e do grupo de Infecções VIH-1 Recentes	72
Figura 20	Análise filogenética das 46 sequências TX _{env} obtidas a partir do grupo das Infecções VIH-1 Antigas e do grupo das Infecções VIH-1 Recentes	74
Figura 21	Análise filogenética das 46 sequências TX <i>env</i> com sequências referência para G ^P	76

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ano e tempo de infecção por caso incluído no grupo Infecções VIH-1 Antigas	46
Tabela 2	Ano e tempo de infecção por caso incluído no grupo Infecções VIH-1 Recentes	47
Tabela 3	Classificação por Blast das sequências TX por caso e região genómica analisada	52
Tabela 4	Classificação por inferência filogenética e bootscaning das sequências TX do grupo das Infecções VIH-1 Antigas	61
Tabela 5	Classificação por inferência filogenética e bootscaning das sequências TX do grupo das Infecções VIH-1 Recentes	70

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensageiro
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferência
BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
cpx	Complexas
CRF	<i>Circulating Recombinant Form</i> ; Formas Recombinadas em Circulação
dNTP	Desoxirribonucleótido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
IDU	<i>Intravenous Drug Users</i> ; Toxicodependentes
IN	Integrase
INSA	Instituto Nacional de Saúde
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i> ; Repetição Longa Terminal
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIPT-Lx	Plano Integrado de Prevenção das Toxicodependências da cidade de Lisboa
PR	Protease
RRE	<i>Rev Responsive Element</i> ; Elemento de Resposta a Rev
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TR	Transcriptase Reversa
TX	Toxicodependente
ULUC	Unidade Laboratorial de Utilização Comum
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
URF	<i>Unique Recombinant Forms</i> ; Formas Recombinadas Únicas
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VIS	Vírus da Imunodeficiência Símia
VIScpz	Vírus da Imunodeficiência dos Chimpanzés

Introdução

1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

1.1 Descoberta do Agente Infeccioso

Nos Estados Unidos da América (EUA) em 1981, foram descritos na população homossexual jovem, casos clínicos nunca antes observados, caracterizados pela apresentação de patologias raras (como a pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*), pela baixa contagem de células T CD4 positivas (CD4⁺) e pela taxa de mortalidade de aproximadamente 100%. A esta nova situação clínica foi denominada de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ^{1, 2}.

Anos mais tarde, em 1983 e em 1986, foram identificados os dois novos retrovírus humanos considerados como os agentes etiológicos da SIDA ^{3,4}. Estes retrovírus foram designados, respectivamente, de Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (VIH-1) e do tipo 2 (VIH-2). Enquanto que o VIH-1 está disseminado mundialmente, sendo o responsável pela pandemia da infecção VIH/SIDA, o VIH-2 encontra-se restrito a regiões da África Ocidental e a países com ligações epidemiológicas com esta região ^{5, 6}. Entre os países europeus, Portugal apresenta o maior número de casos notificados de infecção por VIH-2 ^{7, 8}.

1.2 Curso da Infecção por VIH-1

A SIDA caracteriza-se por uma depleção progressiva dos linfócitos T auxiliares, um dos grupos de células do sistema imunitário que possuem o receptor CD4. Estas células ajudam os linfócitos T citotóxicos a destruir células humanas que apresentam à sua superfície antígenos estranhos ao organismo e estimulam os linfócitos B para a produção de anticorpos ^{9, 10}.

Tipicamente o curso da infecção pelo VIH, na ausência de terapia anti-retroviral, é dividido em três fases (Fig.1):

1. A fase aguda, com uma duração média de 6 a 10 semanas, é iniciada com a infecção das células T $CD4^+$. É caracterizada pelo período de virémia aguda, em que a replicação viral aumenta, há uma forte resposta citotóxica por parte do organismo assim como produção de anticorpos (seroconversão) contra o vírus. Consequentemente, ocorre o decréscimo do número de células T $CD4^+$.
2. Segue-se a fase crónica, com uma duração média de 8 a 10 anos. Esta é uma fase clinicamente latente e assintomática. A replicação viral ocorre a uma taxa menor e a perda de células $CD4^+$ é contínua mas lenta.
3. A entrada no estadio de SIDA deve-se a um aumento elevado da replicação viral e à perda acelerada das células $CD4^+$. O enfraquecimento do sistema imunitário leva a que o organismo fique incapacitado de responder contra as infecções oportunistas que surgem, acabando o paciente por falecer.

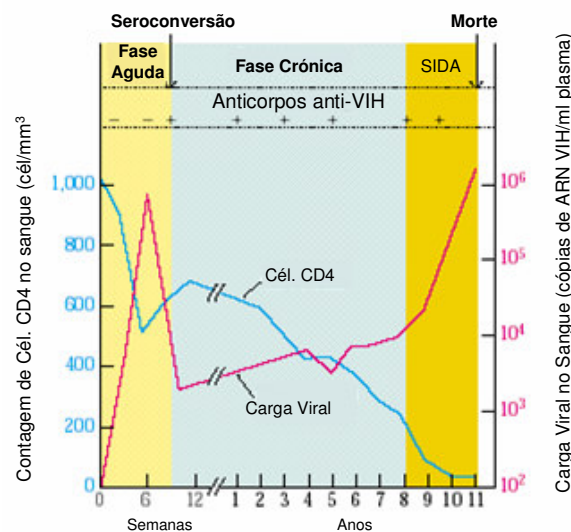


Fig.1: Gráfico representativo das três fases da infecção pelo VIH. A linha azul mostra a variação dos valores das células $CD4^+$ e a linha rosa a da carga viral do VIH no plasma desde a infecção até à morte do paciente. Adaptado de Goldsby *et al*, 2000.

Existem indivíduos em que o curso da infecção não evolui segundo o padrão descrito. Numa percentagem significativa de indivíduos seropositivos (10-15%) observa-se um encurtamento da fase crónica para dois a três anos, atingindo assim rapidamente o estadio de SIDA. Em oposição, uma pequena percentagem (5%) dos indivíduos infectados permanece assintomático para além dos 8 a 10 anos, em que a fase crónica prolonga-se e a contagem dos linfócitos T CD4⁺ permanece nos parâmetros considerados normais^{10, 11}.

No entanto, o decurso natural da infecção por VIH-1 foi drasticamente alterado com a introdução dos vários esquemas de terapia anti-retrovírica, ocorrendo uma redução bastante significativa na morbilidade e na mortalidade dos seropositivos. Actualmente um indivíduo infectado que adere à terapia anti-retrovírica e que consegue manter os níveis de carga viral indetectáveis poderá manter-se assintomático por tempo indeterminado¹².

1.3 Vias de Transmissão

A transmissão do VIH-1 está dependente da concentração do vírus nos fluidos corporais e do contacto entre estes fluidos. A exposição parental a fluidos infectados, através da transfusão sanguínea e da partilha de seringas e material contaminado no consumo de drogas por via endovenosa, tem uma elevada eficácia na transmissão do vírus. A transmissão sexual depende da permeabilidade e integridade das mucosas, apresentando a mucosa rectal, em oposição à oral, uma maior probabilidade de transmissão. A transmissão perinatal pode ocorrer *in utero*, durante o parto, através do contacto do recém-nascido com os fluidos maternos infectados e através do leite materno durante a amamentação^{9, 13, 14, 11}.

Globalmente, a maioria das infecções por VIH são transmitidas entre heterossexuais, embora os casos de transmissão e disseminação do vírus entre toxicodependentes tenha uma importância muito relevante na pandemia do VIH/SIDA.

1.4 Panorama Actual da Infecção VIH/SIDA

Os dados apresentados no último relatório da UNAIDS, publicado em Dezembro de 2007, descrevem o panorama mundial para a infecção VIH/SIDA (Fig.2) que atinge aproximadamente 33 milhões de pessoas, das quais cerca de quatro milhões adquiriram a infecção durante o ano de 2006 ¹⁵.

A África Subsariana continua a ser a região mais atingida por esta pandemia, apresentando um número estimado em 22 milhões de pessoas infectadas. O sul e o sudeste da Ásia apresentam-se juntamente como a segunda região mais atingida pela infecção VIH/SIDA: cerca de 4 milhões de casos de infecção pelo VIH-1 foram contabilizados até ao final do ano de 2007 ¹⁵.

Na Europa Ocidental, Portugal é um dos países que apresenta uma elevada taxa de incidência de VIH^{15,16}. Desde 1983 até ao primeiro semestre de 2007 foram notificados 31 677 casos de infecção VIH/SIDA, 44,4% dos casos associados à categoria de transmissão toxicodependente e 38,3% à categoria de transmissão heterossexual. Desde o início da pandemia até ao ano de 2003 os toxicodependentes foram o grupo populacional mais atingido pela infecção VIH/SIDA no país. Contudo, a partir desse ano observou-se uma inversão da tendência, passando os heterossexuais a ser a categoria de transmissão mais frequentemente notificada. No primeiro semestre de 2007, entre as 402 infecções por VIH-1 notificadas, 64% dos casos ocorreram em heterossexuais e 23% em

toxicodependentes. Actualmente, embora se observe um decréscimo de notificações de casos de infecção em toxicodependentes, este foi o grupo que mais contribuiu para a infecção VIH/SIDA em Portugal ¹⁷.

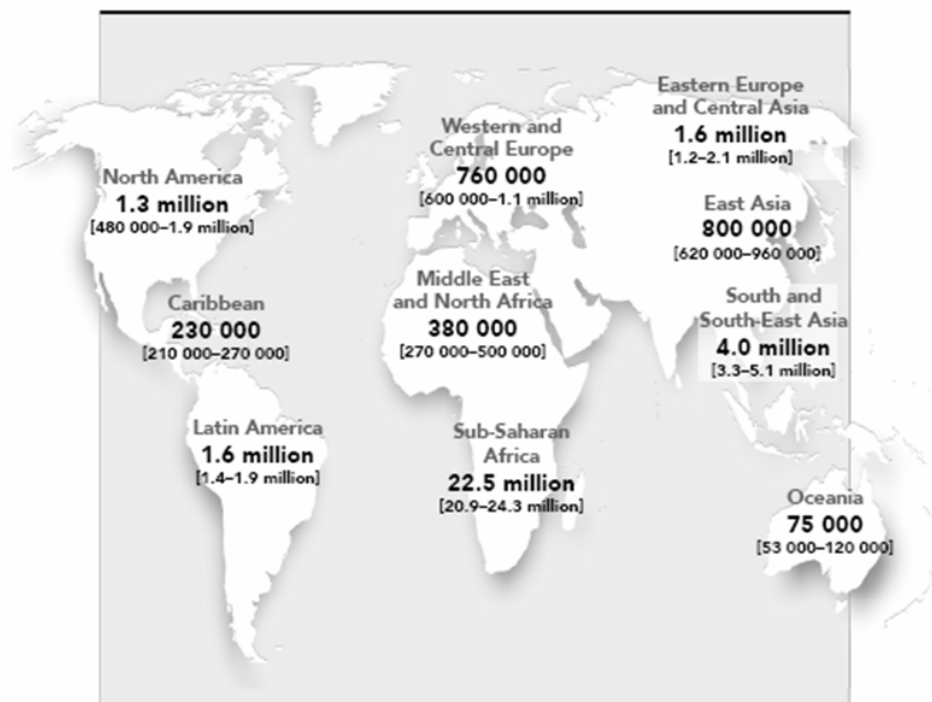


Fig.2: Representação do número de pessoas infectadas pelo VIH no mundo.Extraído do *2007 AIDS Epidemic Update*, UNAIDS.

2. Origem e Evolução do VIH-1

O VIH é um lentivírus filogeneticamente relacionado com outros lentivírus que infectam hospedeiros não humanos, como os primatas e os felinos.

Os humanos não são os reservatórios naturais do VIH e estes vírus foram introduzidos na população humana através transmissões zoonóticas. Os ancestrais dos dois tipos do VIH, denominados de Vírus da Imunodeficiência Símia (VIS), têm como reservatório natural primatas não humanos, cuja infecção não leva ao desenvolvimento da doença^{18, 19, 20, 21}.

As hipóteses estudadas indicam que, enquanto o VIH-2 evoluiu a partir do VISsm que infecta a espécie *Cercocebus atys*, o VIH-1 terá evoluído a partir do VIScpz da subespécie *Pan troglodytes troglodytes*²⁰ (Fig.3). Pensa-se que a primeira transmissão inter-específica ocorreu na década de 30, embora o primeiro caso estudado pertença a um indivíduo infectado na Republica Democrática do Congo e date do ano 1959²². O rompimento da barreira inter-específica foi possível devido a vários factores, entre os quais a co-existência da espécie *Pan Troglodytes* com a do Homem na região Central e Oeste de África. Nessa região observa-se frequentemente a caça corpo a corpo de chimpanzés para alimentação da população e o contacto próximo e frequente dos Homens com chimpanzés, muitos deles tornados animais de estimação. A apoiar esta ancestralidade está o facto dos grupos M, N e O do VIH-1 formarem agrupamentos filogenéticos claros com sequências de VIScpz, indicando a ocorrência de, pelo menos, três episódios de transmissões zoonóticas distintas de chimpanzés para os humanos^{18, 19, 20, 21}.

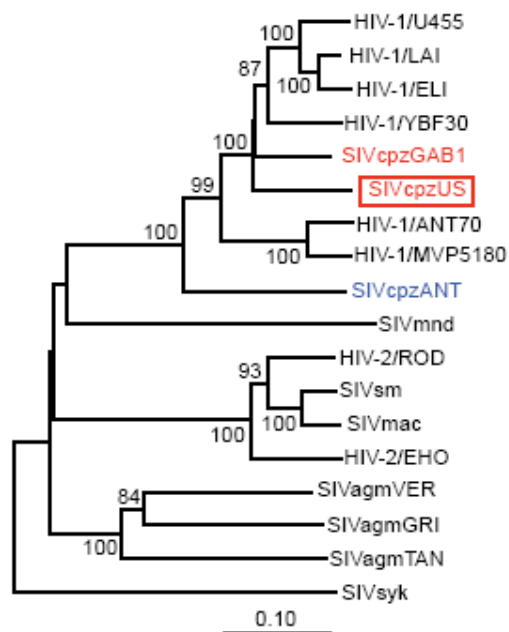


Fig. 3: Relação filogenética de ancestralidade entre os lentivírus de primatas (VIH e SIV) com base no gene *env*. Extraído de Gao, F. *et al*, 1999.

3. Classificação e Estrutura Morfológica do VIH-1

O VIH pertence ao género *Lentivirus*, família *Retroviridae*, cujas características principais são a codificação de uma transcriptase reversa, uma polimerase que sintetiza Ácido Desoxirribonucleico (ADN) a partir de uma molécula molde de ácido ribonucleico (ARN) e a organização genómica desta família descrita através dos três genes básicos: 5'-gag-pol-env-3' ^{9,23}.

O virião maduro do VIH-1 é uma partícula esférica com aproximadamente 10 nm de diâmetro. Esta partícula possui um invólucro lipídico, que tem origem na membrana plasmática da célula hospedeira, onde se encontram inseridas as glicoproteínas gp120 e gp41, associadas em complexos glicoproteicos. Internamente ao invólucro encontra-se a matriz, com funções estruturais, formada por proteínas p17 miristiladas. Internamente à matriz encontra-se a cápside viral

em forma de cone truncado, constituída por proteínas p24. A cápside transporta o genoma viral (ARN) dimérico associado às nucleoproteínas p7, à transcriptase reversa (TR) e a ARN de transferência (ARNt) celulares para a Lisina, que servirão de *primers* para o início da síntese da dupla cadeia de ADN a partir do genoma viral. Igualmente no interior da cápside encontram-se as enzimas integrase (IN), protease (PR) e as proteínas acessórias Vif, Vpr e Nef (Fig.4) ^{9, 12, 24}.

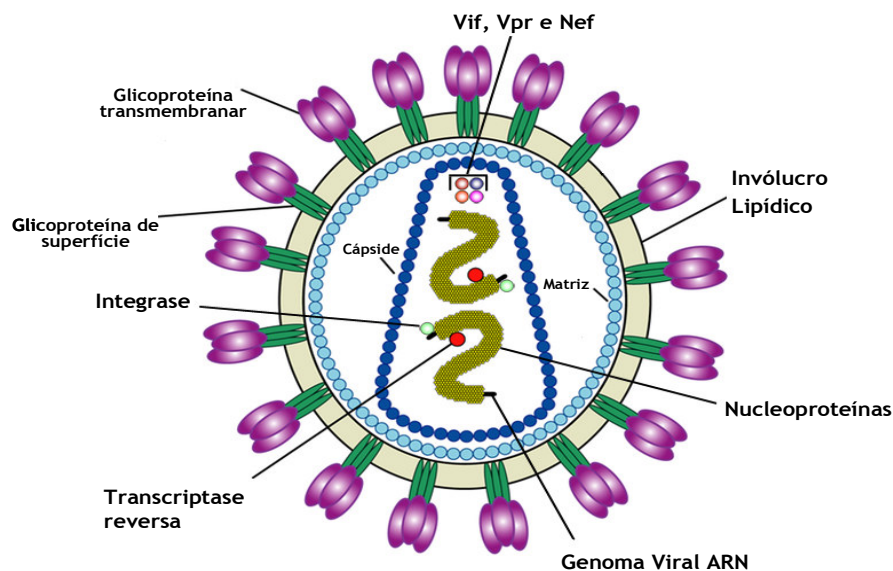


Fig.4: Representação esquemática de um virião maduro de VIH-1, onde se visualiza os seus vários constituintes. Adaptado a partir de www.en.wikipedia.org/wiki/HIV.

4. Organização do Genoma do VIH-1

O genoma do VIH-1 é composto por duas moléculas de ARN de polaridade positiva, com aproximadamente 9,8 Kb (Fig.5). O vírus potencia ao máximo a capacidade do seu genoma utilizando as três grelhas de leitura para a codificação de proteínas. Estando dependente da maquinaria celular para a sua replicação e transcrição, as duas cadeias de ARN possuem características semelhantes às dos transcritos celulares, como a presença de uma cauda poliA a 3'. ^{24, 9,25}

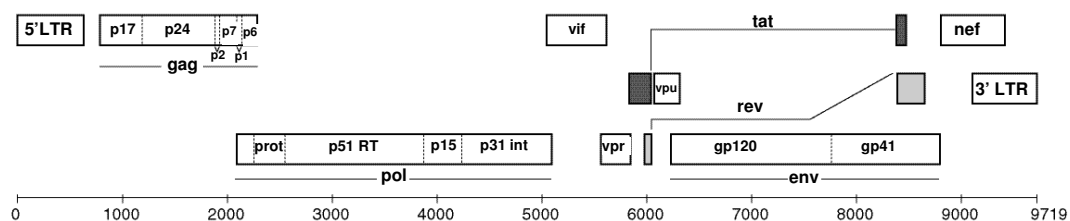


Fig 5: Representação esquemática do genoma proviral do VIH-1. Os genes estão organizados consoante a grelha de leitura e os eventos de processamento. A unidade da escala está em bases nucleotídicas. Adaptado a partir de <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/MAP/landmark.html>

Genomicamente o vírus apresenta, para além dos genes *gag*, *pol* e *env*, seis genes adicionais: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (Fig.5). As extremidades do genoma são regiões não codificantes constituídas por dois elementos: a região R, que se repete nas duas extremidades, o elemento U3 a 3' e o elemento U5 a 5'. Quando na forma de provírus, como resultado do processo de retrotranscrição, estes elementos são transformados nas LTRs (*long terminal repeats*), regiões idênticas terminais divididas nos três elementos mencionados: U3/R/U5¹².

Gag e *pol* são transcritos inicialmente na forma de uma poliproteína com 160 kDa que, após a acção enzimática da protease viral, resulta na proteína precursora p55/Gag e no precursor de Pol. A p55 é clivada em quatro proteínas (p6 - gemulação, p24 - cápside, p17 - matriz e p7 - nucleoproteínas). *Pol* contém a informação para a tradução das enzimas cruciais para o ciclo replicativo: p66 (TR), p32 (IN) e p11 (PR)^{9, 12, 24,26}.

O gene *env* codifica para a glicoproteína gp160 que, após processamento proteolítico, dá origem à glicoproteína de superfície gp120 e à glicoproteína transmembranar gp41. A proteína de superfície possui os domínios de ligação ao receptor e aos co-receptores celulares, assim como os de neutralização, enquanto

a proteína transmembranar possui o péptido de fusão, essencial para que ocorra a coalescência da membrana plasmática com o invólucro viral^{9, 12, 24,26}.

Os genes *tat* e *rev* codificam para proteínas reguladoras e são expressos na fase inicial da replicação, juntamente com a proteína Nef. Tat promove a transcrição de ARNm de tamanho completo. Rev controla temporalmente a expressão dos genes iniciais e dos genes tardios, assim como a exportação dos transcritos do núcleo para o citoplasma^{9, 12, 24,26}.

As **proteínas acessórias** desempenham várias funções, como no controlo da maquinaria celular de replicação e na capacidade infecciosa dos viriões descendentes^{9, 12, 24,26}.

5. Ciclo de Vida do VIH-1

5.1 Células Hospedeiras

O tipo de células que o VIH-1 infecta é determinado pelo reconhecimento do vírus para as diferentes moléculas presentes à superfície celular. A molécula CD4 é o receptor por excelência do VIH-1. Esta molécula, da família das imunoglobulinas, encontra-se à superfície de várias células pertencentes ao sistema imunitário, tornando-as alvo de infecção. O VIH-1 infecta e replica primariamente nos linfócitos T auxiliares (células CD4⁺) e nos macrófagos. Enquanto a replicação nos linfócitos T provoca lise celular, nos macrófagos os vírus replicam a uma taxa menor e os viriões são inclusos temporariamente em vacúolos, fazendo com que estes funcionem como importantes reservatórios de VIH-1 no corpo humano. A infecção das células microgliais, uma linha de macrófagos existentes no cérebro, leva à perda de neurónios e ao aparecimento de demência, que pode ser observada

no estadio avançado de SIDA. O VIH-1 é igualmente capaz de ligar-se à superfície das células dendríticas, levando à alteração destas células para apresentadoras de antígeno que migram para os nódulos linfáticos, onde se encontram os linfócitos T CD4⁺ *naive*. As células de Langerhans são um tipo de células dendríticas que circulam na superfície dos epitélios das mucosas e estão directamente relacionadas com a transmissão sexual do VIH-1^{9, 12, 26, 27, 28, 29}.

5.2 Ciclo de replicação do VIH-1

O ciclo de replicação do VIH-1 divide-se em duas fases: a fase inicial, desde a ligação do vírus à célula até à integração do provirus e a fase tardia, que começa com a expressão dos genes virais e acaba com a libertação da descendência viral madura (Fig.6). Entre estas duas fases existe o período de latência clínica em que vírus expressam os seus genes a um nível basal^{23, 30, 31}.

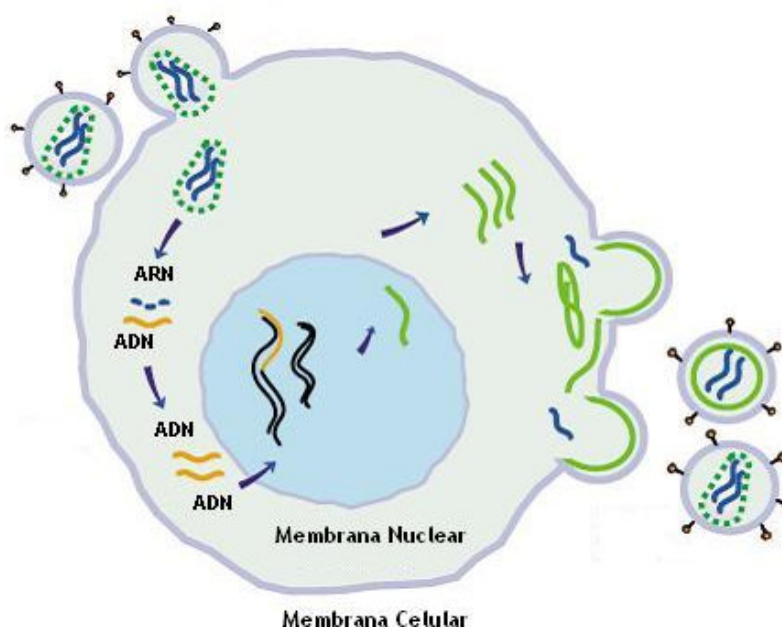


Fig. 6: Representação do ciclo de vida do VIH-1: adsoção, infecção celular, desencapsidação, retro-transcrição, formação e integração do provirus e libertação da descendência viral por genulação. Adaptado a partir de Simon V. *et al* 2006

Fase inicial: O virião adsorve à superfície celular através do reconhecimento do receptor CD4 por parte da gp120. Esta ligação leva a alterações estruturais na glicoproteína de superfície, que expõe os domínios de ligação aos co-receptores, essenciais para que ocorra uma infecção celular eficaz. No início da infecção a maioria das estirpes do VIH-1 (denominadas de R5) utiliza o co-receptor CCR5. Com a progressão para o estadio de SIDA emergem as estirpes capazes de utilizar a molécula CXCR4 (denominadas de X4) ou ambas as moléculas (denominadas de R5X4) como co-receptores. A adsorção eficaz à membrana celular leva à apresentação do péptido de fusão (porção N-terminal da gp41), o que conduz à coalescência do invólucro viral com a membrana celular. Consequentemente, a cápside viral é libertada no citoplasma, ocorre a desencapsidação e inicia-se a transcrição reversa: utilizando o ARNt^{Lys} como *primer*, a TR converte as duas moléculas de ARN numa dupla cadeia de ADN viral. A TR dissocia-se e a dupla cadeia é conduzida pela IN e Vpr até ao interior do núcleo onde ocorre a formação do provírus, com a integração do ADN viral no genoma celular^{32, 33}.

Fase Final: A proteína Tat é a responsável pela mobilização da maquinaria de replicação celular para a expressão dos genes provirais. A proteína Rev controla temporalmente a expressão destes. Inicialmente são expressas as proteínas Tat, Rev e Nef. A partir de uma determinada concentração de Rev no núcleo, esta proteína promove a alteração para a transcrição dos genes tardios. Nestes transcritos Rev reconhece a região RRE (*Rev Responsive Element*), localizada no gene *env*, que permite à proteína Rev conduzir os transcritos até ao citoplasma para serem traduzidos em proteínas estruturais e funcionais. As proteínas virais, assim como os ARNm de tamanho total (futuro genoma viral), são conduzidos para a

membrana celular, local onde ocorre a montagem das partículas virais descendentes. As glicoproteínas gp120 e gp41 são integradas na membrana plasmática nas suas posições funcionais. As proteínas acessórias que regulam a formação e maturação dos viriões, juntamente com a PR, são encaminhadas até à membrana plasmática. Após as proteínas estruturais adoptarem as suas posições correctas junto à membrana e os ARN virais interagirem com as nucleoproteínas, a descendência viral é libertada por gemulação. A maturação dos viriões ocorre após a gemulação através da acção enzimática da PR. Após este processo a descendência viral está pronta a iniciar um novo ciclo de infecção celular^{25, 34}.

6. Mecanismos para a Variabilidade Genética do VIH-1

O VIH-1 apresenta uma enorme variabilidade genética que lhe possibilita uma rápida evolução. Esta característica resulta do conjunto de vários factores inerentes à estratégia de replicação viral.

A transcriptase reversa é uma polimerase propensa a efectuar erros durante o processo de síntese/extensão de uma cadeia de ADN, que não são corrigidos devido a esta enzima não possuir actividade exonucleásica 3'→ 5'. Estima-se que a frequência de erro por ciclo replicativo seja de $3,4 \times 10^{-5}$ (aproximadamente uma substituição nucleotídica por ciclo). A recombinação é um processo inerente à retrotranscrição que ocorre devido à TR usar simultaneamente as duas cadeias de ARN genómico viral como modelos. Todos estes processos, que culminam numa enorme variabilidade genética, são potenciados pela elevada taxa de replicação, estimando-se que possam ser produzidos 10^{10} viriões por dia num indivíduo infectado^{26, 35, 36, 37}.

Como consequência destes processos, co-existem populações virais geneticamente relacionadas mas não idênticas num hospedeiro infectado pelo VIH-1. Estas são designadas de *quasiespécie* e permitem que o vírus apresente uma grande capacidade adaptativa quando colocado sob pressões selectivas exercidas pelo hospedeiro (polimorfismos genéticos e resposta imunitária, entre outras) ou, inclusivamente, pelas terapias anti-retrovirais administradas, que pode resultar no aparecimento de mutações que conduzem a resistências aos fármacos ^{12, 36, 38}.

7. Diversidade Genética do VIH-1

7.1 Grupos M, N e O

As estirpes do VIH-1 dividem-se em três grupos (M - *major*, O - *outlier* e N - *new*) que correspondem a três linhagens geneticamente distintas. Os casos de infecção incluídos nos grupos O e N são os que se encontram com uma distribuição geográfica mais restrita, sendo os vírus do **grupo O** diagnosticados sobretudo em indivíduos oriundos da África Central ⁴⁰; os raros casos identificados como pertencentes ao **grupo N** foram diagnosticados em indivíduos dos Camarões ⁴¹. Os vírus classificados no **grupo M** são os que se encontram disseminados, estando este grupo associado à actual pandemia da infecção VIH/SIDA. A grande diversidade dentro deste grupo levou à sua subdivisão em **subtipos, sub-subtipos e CRFs** ^{5, 36, 42, 39}.

O grupo N é filogeneticamente equidistante dos grupos M e O. Entre estes dois últimos, as proteínas Env diferem entre 30 a 50% na sua sequência aminoacídica. Com base no mesmo parâmetro de comparação, dentro do grupo M, os diferentes subtipos são aproximadamente equidistantes uns dos outros, apresentando uma

variação de 25 a 35%; dentro de cada subtipo pode verificar-se uma diferença aminoacídica das proteínas Env entre 10 e 15%^{43,44, 45}.

7.2 Formas Geneticamente Recombinadas

Com a análise dos genomas virais completos verificou-se que o VIH-1 pode atingir uma complexidade genómica extrema, compreendendo na sua extensão regiões pertencentes a diferentes subtipos ou ainda regiões por classificar (regiões designadas pela letra U - *unclassified*). Estas formas geneticamente recombinadas encontram-se em grande número no grupo M e estão divididas em dois tipos: Formas Recombinadas em Circulação (**CRF** - *Circulating Recombinant Form*) e Formas Recombinadas Únicas (**URF** - *Unique Recombinant Forms*). As estirpes são denominadas de CRFs quando um padrão genómico idêntico é identificado em pelo menos três indivíduos infectados sem ligações epidemiológicas. Quando este tipo de composição genómica é encontrado num único indivíduo, esta é classificada como URF (devido a ainda não ter sido comprovada a sua capacidade de transmissibilidade e disseminação). As CRFs são uma pequena percentagem dos vários recombinantes que surgem individualmente, cujo sucesso na sua transmissão se deve a características biológicas que lhe conferem uma *fitness* que permite superar pressões selectivas. A recombinação entre diferentes CRFs resulta numa segunda geração de recombinantes, normalmente denominadas de formas “complexas” (cpx), sendo a diversidade intragénica elevada e apresentando uma contínua capacidade de disseminação na população^{5,6, 36, 37}.

7.3 Classificação Molecular do grupo M

A grande diversidade genotípica do grupo M reflecte-se na sua subdivisão em nove subtipos (designados pelas letras A-D, F-H, J e K), quatro sub-subtipos (A_1 e A_2 para o subtipo A; F_1 e F_2 para o subtipo F) e 34 CRFs, identificados e disponíveis para consulta na base de dados *Los Alamos* (<http://www.hiv.lanl.gov/>)^{6,36}. Actualmente existem estudos no Senegal e na República Democrática do Congo com base na análise de genomas completos, que reconhecem a existência de, pelo menos, mais dois sub-subtipos para o subtipo A (A_3 e A_4)^{46, 47,48, 49}.

O grupo M incluiu inicialmente dois subtipos, designados pelas letras E e I. Contudo, após a análise do genoma completo, verificou-se que estes vírus eram formas geneticamente recombinadas: o subtipo designado por E era uma conjugação do putativo subtipo E (para o qual ainda não foi isolada nenhuma sequência pura), com o subtipo A, o que levou à identificação da primeira CRF (CRF01_AE)⁵⁰; o subtipo I reunia regiões genómicas pertencentes aos subtipos A, G, H e K com regiões ainda por classificar, cuja forma viral foi posteriormente identificada como CRF04_cpx^{51,37}. Com a posterior análise completa dos genomas virais dos subtipos classificados como B e D, verificou-se que estes apresentavam uma distância genética menor entre eles relativamente aos restantes subtipos identificados, o que, em face à nomenclatura actual seguida poderia levar à sua re-classificação como sub-subtipos. Embora este facto seja referenciado frequentemente na literatura, a respectiva alteração da sua classificação não foi proposta^{22, 52}.

As formas geneticamente recombinadas são responsáveis por cerca de 20% das infecções mundiais pelo VIH-1⁵³. Em regiões onde a diversidade é vasta, como é o caso da África Central e Subsariana, estas variantes ocorrem com muita frequência e conseguem ser transmitidas com uma taxa de sucesso muito elevada. Nestes

países estima-se que mais de 50% das estirpes isoladas tenham um genoma que resulta da recombinação genética entre diferentes formas virais. As regiões geográficas que apresentam uma elevada diversidade viral e ocorrência frequente de co-infecções nos indivíduos são apelidadas de *hotspots* geográficos^{49, 54}. Fora do continente africano, estes *hotspots* estão associados à importância da população toxicodependente na disseminação da infecção VIH/SIDA^{54,22}.

Os primeiros recombinantes descritos foram isolados em 1994 no Brasil e apresentavam um genoma onde se identificavam regiões pertencentes ao subtipo B e F⁵⁵. Contudo, a primeira CRF a ser classificada foi a CRF01_AE, oriunda da África Central mas que se tornou epidémica no início da década de 90 na Tailândia transmitida sexualmente através da população de prostitutas⁵⁰. Posteriormente foi disseminada à população heterossexual de países vizinhos como o Vietname, o Camboja, as Filipinas e a China. A grande *fitness* adaptativa desta nova variante foi constatada quando também se introduziu com sucesso na população de toxicodependentes da Tailândia, tornando-se na forma genética predominante na infecção do VIH-1 neste grupo em detrimento do subtipo B^{37, 45, 49}.

8. Distribuição de Subtipos e CRFs do VIH-1 no Mundo

Globalmente são quatro as formas genéticas responsáveis pela pandemia VIH/SIDA: o subtipo C, o subtipo A (sub-subtipo A1), a CRF02_AG e o subtipo B^{5,53, 45,56}. O **subtipo C** é identificado em 50 a 60% das infecções a nível mundial, com maior impacto na África Subsariana, em países como a Etiópia e a África do Sul (cerca de 90% das infecções devem-se a este subtipo) e também no Sul do continente Asiático, em países como a China e a Índia³⁴. Contudo, na região central de África, a infecção VIH/SIDA deve-se principalmente ao **subtipo A** (com maior

prevalência em países como o Quênia, Uganda e Ruanda) e à **CRF02_AG**, responsável pela maioria das infecções descritas no Senegal, República Democrática do Congo e Camarões. Fora do continente Africano, o subtipo A atingiu proporções elevadas na população toxicodependente da Europa do Leste. O **subtipo B** é predominante na Europa, EUA e Austrália, embora se comece a observar a introdução e disseminação eficaz de outras variantes genéticas do VIH-1^{53,39}.

As restantes variantes genéticas conhecidas do VIH-1 são observadas em epidemias mais localizadas: o subtipo D está presente em países como o Uganda e o Quênia; o subtipo F (maioritariamente o sub-subtipo F1) tem sido identificado em infecções na África Central, na Europa do Leste (principalmente na Roménia) e na América do Sul (frequentemente a CRF12_BF); o subtipo G está presente na África Central, com maior prevalência na Nigéria, nas Caraíbas e na Europa Ocidental, ganhando proporções significativas em países como Portugal e Espanha, existindo tanto na forma pura ou recombinada com o subtipo B (CRF14_BG); o subtipo H e o subtipo K estão presentes em epidemias na África Central; o subtipo J atingiu maiores proporções na América Central (Fig.7).^{49,44,39}

É no continente Africano que se pode encontrar a maior diversidade molecular da infecção VIH-1, estando presente todos os grupos e subtipos virais (Fig.7). Este facto está de acordo com a hipótese da origem do vírus ser Africana. Foi na República Democrática do Congo que se identificou o caso mais antigo de infecção pelo VIH-1. A presença simultânea dos diferentes subtipos potencia o aparecimento de novos recombinantes virais com capacidade de disseminação epidémica e explica a razão do continente Africano ser o berço de origem da maioria das CRF identificadas. Contudo, existem exemplos de CRFs que surgiram fora deste

continente, como na população toxicodependente da Rússia (CRF03_AB), da Península Ibérica (CRF14_BG) e da China (CRF07_BC e CRF08_BC) ^{36, 57, 58,59, 60}.



Fig. 7: Mapa-mundo com a distribuição das formas genéticas do VIH-1, salientando-se as formas mais prevalentes pela maior capitalização das letras. Extraído de Thomson MM *et al* Lancet Infect Dis. 2002 2(8):461-71

9. Caracterização Molecular da Infecção VIH-1 no Continente Europeu

O primeiro caso de infecção pelo VIH-1 descrito na Europa foi diagnosticado num pescador norueguês e associado a um vírus do grupo O. A infecção terá ocorrido na década de 60, por contacto heterossexual, nos portos da África Ocidental⁵². Até à década de 90 os casos descritos de infecção por VIH-1 no continente Europeu eram classificados, na sua grande maioria, como subtipo B. Os casos de infecções por variantes genéticas “não B” eram em número reduzido e ocorriam sobretudo em imigrantes africanos residentes na Europa do Norte e em toxicodependentes na Rússia⁵⁵. Contudo, este panorama de infecção tem vindo a alterar-se gradualmente no tempo: observa-se que, adicionalmente à maior prevalência do subtipo B no continente Europeu, existe agora uma crescente importância pelo subtipo A na epidemia VIH/SIDA ⁵⁸ (Fig.7).

9.1 Infecção na Europa do Leste

De acordo com os relatórios publicados pela UNAIDS e OMS, a Europa do Leste apresenta o aumento mais rápido do número de casos de infecção por VIH-1 no cenário actual da pandemia VIH/SIDA ^{16, 61}.

Até 1995 nos países que pertenceram à ex-União Soviética era descrita uma baixa prevalência de infecções classificadas como subtipo B e transmitidas maioritariamente por via sexual. Porém, durante esse ano verificou-se a ocorrência de dois surtos epidémicos na população toxicodependente de duas cidades da Ucrânia, por dois subtipos distintos: subtipo A (sub-subtipo A1) em Odessa e subtipo B em Nicolayev. A disseminação do subtipo A foi rápida, atingindo a população toxicodependente dos países da ex-União Soviética e vizinhos. A co-circulação do subtipo A com o subtipo B, na Ucrânia, conduziu ao consequente aparecimento da CRF03_AB, que foi posteriormente introduzida na Rússia, tornando-se a forma viral prevalente na população toxicodependente de Kaliningrad ^{58,62, 63, 64, 65}.

Na Roménia o subtipo F é predominante, sendo o resultado de infecções nosocomiais pediátricas que ocorreram entre 1986 e 1991 por via parentérica, através da utilização de material hospitalar contaminado⁶⁶.

A epidemia do VIH-1 na Europa do Leste é hoje dominada pelo subtipo A (resultado de uma única introdução a partir da Ucrânia), seguido do subtipo B e da CRF03_AB, e está associada à população toxicodependente ^{39, 62, 63}. Esta situação é explicada num contexto histórico centrado na desagregação da União Soviética, que conduziu a uma grave crise socioeconómica e ao aparecimento de redes de tráfico de drogas e práticas de risco associadas ao seu consumo. Contudo, actualmente observa-se uma alteração neste padrão de transmissão, existindo um

aumento significativo das infecções transmitidas por via heterossexual, sugerindo que a infecção foi já introduzida na comunidade em geral.

9.2 Infecção na Europa Central

A Europa Central é a região que apresenta a menor prevalência de infecções pelo VIH-1 do continente Europeu, sendo na sua maioria transmitidas por relações hetero e homossexuais ⁶⁷. A epidemia VIH/SIDA teve início a meio da década de 80 e a prevalência manteve-se sempre em níveis considerados baixos, com excepção da Polónia e ex-Jugoslávia (Sérvia e Montenegro) ⁶⁸. Nestes países observou-se um pico epidémico relacionado com a entrada do vírus na população toxicodependente. Até hoje esta é a população que mais tem contribuído para a epidemia VIH/SIDA nesses países ⁶⁹.

O início da epidemia na Europa Central ocorreu através de múltiplas introduções do subtipo B o que se reflecte na heterogeneidade dos isolados identificados nesta região. Presentemente, este subtipo é ainda o principal responsável pelas infecções por VIH-1 diagnosticadas nesta região. Contudo, tem vindo a observar-se o aparecimento de casos de infecção caracterizados por subtipos não B. A Suíça foi o primeiro país a apresentar uma percentagem significativa (30%) de infecções por variantes virais não B, nomeadamente pelos subtipos A e C e pela CRF11_cpx, esta última na população toxicodependente ⁷⁰. Na Finlândia, no início da epidemia do VIH-1, os casos de infecção na população toxicodependente eram raros e classificados como subtipo B. No entanto, a meio da década de 90 na população toxicodependente a CRF01_AE passou a ser a principal variante responsável por estas infecções ^{37, 52, 58}. Na Eslovénia a diversidade genotípica do VIH-1 já é constatada na população nativa do país,

identificando-se principalmente os subtipos C e F e as formas recombinadas CRF01_AE e CRF02_AG ⁷¹. Nos restantes países verifica-se um padrão comum, em que o subtipo B é o principal responsável pelas infecções por VIH na população nativa e as variantes não B surgem associadas ao aumento dos movimentos migratórios das populações provenientes de regiões africanas.

A baixa prevalência e o padrão epidemiológico da infecção VIH-1 observados na Europa Central, principalmente nos países ex-comunistas, contrastam com os da Europa do Leste, observando-se uma maior resistência à disseminação do vírus. Factores que favorecem esta situação poderão estar relacionados com os programas de prevenção instituídos na Europa Central, assim como com o mais elevado nível socioeconómico e o menor índice de desemprego entre a população jovem, o que pode levar a uma menor adesão ao consumo de drogas e à prática de prostituição.

9.3 Infecção na Europa Ocidental

A epidemia do VIH-1 na Europa Ocidental teve início na década de 80 com a introdução do subtipo B na população homossexual a partir dos EUA. Posteriormente, assistiu-se a uma rápida disseminação desta forma genética para a população toxicodependente ⁷². Porém, enquanto na população homossexual se verificou um decréscimo acentuado na incidência do VIH-1, a população toxicodependente continua a ter um papel preponderante na epidemia VIH/SIDA, nomeadamente em países como Portugal e Espanha ^{73, 74}. Paralelamente, verifica-se a disseminação da infecção na população heterossexual, bem visível em países como a Itália, a Bélgica e a França ^{75, 76, 77}. A emergência da infecção em heterossexuais está associada à introdução das variantes não B através de nativos

africanos imigrantes para a Europa. Os fortes laços históricos, sociais e políticos que ligam alguns países, como Portugal e França ao continente Africano fazem com que os imigrantes da África Subsariana constituam uma grande população residente na Europa Ocidental^{78, 79}.

Embora em países europeus como a Itália e o Luxemburgo se continue a observar que a infecção por variantes não B ocorra principalmente em indivíduos imigrantes^{80, 81}, verifica-se também a passagem destas variantes para a população nativa europeia. Na Bélgica os subtipos A e C atingiram igual importância na infecção VIH-1 entre heterossexuais sem existir uma ligação epidemiológica directa conhecida dos indivíduos infectados com o continente Africano⁷⁶. Em França, embora o subtipo B continue a ser o predominante, já em 1995 tinham sido detectados todos os subtipos conhecidos à data⁷⁷.

A identificação da CRF14_BG na Península Ibérica é um outro exemplo de uma variante não B em circulação na população de nativos Europeus. Dois estudos realizados na Galiza mostraram um número considerável de infecções pelo subtipo G, com origem no continente africano, e de formas recombinantes BG em toxicodependentes nascidos na Galiza e em Portugal. A partir destes estudos resultou a classificação da CRF14_BG^{58, 57, 36, 82, 74, 83}. Em estudos posteriores, com a análise da totalidade dos genomas virais, foi confirmada que esta variante era identificada apenas em indivíduos cuja infecção tinha decorrido na Península Ibérica (nativos de Portugal ou Espanha ou residentes temporários nesta região)⁵¹.

Portugal está entre os países com a maior taxa de incidência de infecções por VIH-1 na Europa Ocidental. Em 2005 foi considerado, juntamente com a Estónia, como um dos *hotspots* geográficos do continente Europeu, factor associado à

importância do papel que os toxicodependentes assumem nas respectivas epidemias^{16,84, 83}.

O primeiro caso descrito em Portugal data de 1983⁷⁸. Desde o início da década de 90 que a prevalência da infecção VIH-1 tem crescido até tomar as proporções actuais. Tal como os restantes países da Europa Ocidental, a epidemia iniciou-se entre o grupo dos homossexuais. No entanto, pouco tempo depois verificou-se uma alteração no padrão das vias de transmissão, assumindo os toxicodependentes um papel preponderante na disseminação da infecção. Os toxicodependentes são um grupo com grande impacto na epidemia VIH/SIDA em Portugal, tendo um papel muito activo na disseminação da infecção para a população em geral. Contudo, tem vindo a observar-se uma diminuição da incidência das infecções por VIH-1 neste grupo, acompanhado pelo aumento do número de casos no grupo dos heterossexuais, sendo este actualmente o mais atingido pela infecção VIH/SIDA¹⁷.

O primeiro estudo publicado com a caracterização molecularmente das estirpes de VIH-1 diagnosticadas em indivíduos residentes em Portugal⁷⁸ englobou indivíduos infectados por via heterossexual e via parentérica (por partilha de material contaminado no consumo de drogas endovenosas). Observou-se que o subtipo B era responsável por cerca de 50% das infecções caracterizadas e que a presença de subtipos não B estava relacionada com a naturalidade dos indivíduos infectados, tendo sido encontrados principalmente nos indivíduos de origem africana. Em estudos posteriores constatou-se que a diversidade de formas genómicas do VIH-1 estava em expansão e que a sua disseminação para a população nativa portuguesa ocorria em populações com comportamento de risco e começava a ser introduzido na comunidade em geral.^{83, 73, 85}

Fundamentação

Os estudos de epidemiologia molecular do VIH-1, com identificação e classificação de novas formas virais, têm inequivocamente demonstrado a elevada diversidade genética e a enorme capacidade destes vírus produzir novas variantes genéticas, que podem ser potencialmente de maior virulência e transmissibilidade e que nos últimos anos detêm um importante papel na pandemia da infecção VIH/SIDA.

Esta diversidade no genoma do VIH-1 tem grandes implicações no desenho de ensaios de detecção e diagnóstico das infecções virais. Inicialmente estes eram desenvolvidos com base no genoma do subtipo B e poderiam não detectar com a mesma eficácia outras formas genéticas em circulação na população.

A eficácia dos regimes terapêuticos instituídos aos pacientes pode também ser influenciada consoante a variante do vírus em causa, existindo diferenças nas propriedades biológicas assim como na susceptibilidade aos anti-retrovíricos.

O desenvolvimento de vacinas deve igualmente ter em conta a epidemiologia molecular da infecção na população que pretende beneficiar para que, quando administrada, possa ser garantida uma maior eficácia.

Sendo conhecida a resistência natural de determinados subtipos a certos anti-retrovíricos (como do subtipo G e CRF14_BG aos Inibidores da Protease), ^{95, 96} este estudo pode fornecer informação importante sobre formas genéticas e variantes virais em circulação que devem ser tomadas em linha de conta no curso da infecção. Assim, o conhecimento da diversidade genética da infecção VIH-1 na população, com caracterização molecular da epidemia, pode ser uma mais-valia para o desenvolvimento dos testes de diagnóstico e detecção do VIH-1, para o desenho de vacinas e na orientação das terapias anti-retrovíricas.

Objetivos

O estudo proposto pretende conhecer, ao longo do tempo, o evoluir da diversidade genotípica do VIH-1 e a sua evolução no tempo, no grupo de indivíduos infectados, com comportamento de risco, residentes em Lisboa, cuja via provável de infecção foi a partilha de seringas e material contaminado aquando do uso de drogas endovenosas.

O principal critério de inclusão dos casos a analisar atende ao conhecimento da data provável de infecção VIH-1, resultando agrupamento da população alvo em dois grupos:

- Grupo Infecções VIH-1 Antigas

Grupo de indivíduos seguidos desde 1994, cujo diagnóstico de infecção foi efectuado entre os anos de 1994 a 1998. Este grupo de indivíduos tem um tempo máximo de infecção de 14 anos.

- Grupo Infecções VIH-1 Recentes

Grupo de indivíduos seguidos desde 2002, mas cujo diagnóstico de infecção foi efectuado nos anos 2004 a 2006. Este grupo de indivíduos tem um tempo máximo de infecção de quatro anos.

A distribuição dos indivíduos infectados em dois grupos separados temporalmente permite a caracterização molecular da infecção com identificação e classificação dos vírus presentes nos dois grupos, bem como conhecer a possível evolução do padrão molecular ao longo do tempo. Os procedimentos técnicos a efectuar têm o intuito de classificar as formas genéticas do VIH-1, com base na análise de duas regiões genómicas (*gag* e *env*) em ambos os grupos estudados. Desta forma poder-se-á confirmar, ou não, uma possível evolução no padrão

molecular dos vírus que representam a infecção VIH-1 nos dois grupos de toxicodependentes estudados.

Desenvolvimento do Estudo

1. Descrição do Estudo

Estudo de caracterização molecular com análise de sequências das regiões *env* e *gag* do VIH-1 por inferência filogenética a partir de uma população de indivíduos toxicodependentes infectados, cujo ano de infecção por VIH-1 é conhecido.

2. Critérios de Inclusão

Na selecção retrospectiva dos casos a estudar foram considerados os seguintes critérios:

- Infecção VIH-1 confirmada laboratorialmente;
- Confirmação de práticas de risco no consumo de drogas por via endovenosa;
- Conhecimento do ano provável em que ocorreu a infecção por VIH-1;
- A data de infecção estar compreendido nos intervalos de tempo propostos entre 1994 e 1998 (Infecções VIH-1 Antigas) e entre 2004 e 2006 (Infecções VIH-1 Recentes);
- Possibilidade de realização de colheita de sangue durante o ano de 2006.

3. Entidades Envolvidas

O Gabinete de Apoio ao Toxicodependente, pólo Oriental de Lisboa, que coordena o Plano Integrado de Prevenção das Toxicodependências da cidade de Lisboa (PIPT-Lx) e a Unidade de Retrovírus/Laboratório de Referência da SIDA do Instituto Nacional de Saúde (INSA) onde foi realizado o diagnóstico da infecção por VIH-1 dos casos incluídos neste estudo e, simultaneamente, desenvolvido este projecto de investigação.

4. Aspectos Éticos

Os indivíduos autorizaram a sua participação no estudo através de consentimento informado (ver anexo I). À data da colheita das amostras foi pedido o preenchimento de um questionário (ver anexo II) para recolha de informações epidemiológicas e demográficas no contexto do estudo, tendo sido mantida a confidencialidade no tratamento de dados.

O desenvolvimento do presente projecto obteve um parecer favorável por parte da comissão de ética do INSA.

Material e Métodos

1. Caracterização da População Estudada

A população alvo integrou um grupo de toxicodependentes com comportamentos de risco para a infecção VIH-1, inseridos no Programa de Metadona de Baixo Limiar, no âmbito do Plano Integrado de Prevenção das Toxicodependências da cidade de Lisboa. O seguimento dos indivíduos pelas duas entidades envolvidas neste estudo permitiu determinar o ano provável em que ocorreu a infecção e seleccionar retrospectivamente, de acordo com os critérios de inclusão, os indivíduos que se infectaram em dois períodos de tempo diferentes, com uma separação temporal mínima de cinco anos:

- a. Grupo Infecções VIH-1 Antigas: este grupo inclui casos de infecção por VIH-1 que ocorreram antes de 1998 (inclusive). Estes indivíduos iniciaram o seu seguimento laboratorial para a pesquisa de anticorpos anti-VIH-1 em 1994, apresentando um resultado positivo entre 1994 e 1998. Para este grupo o período de tempo de infecção à data da colheita (2006) foi no mínimo de 8 anos.
- b. Grupo Infecções VIH-1 Recentes: este grupo inclui os casos de infecção VIH-1 que ocorreram entre 2004 e 2006. Estes indivíduos foram seguidos laboratorialmente desde 2002, através da pesquisa de anticorpos anti VIH-1. A identificação do ano provável de infecção foi efectuada tendo por base o aparecimento do primeiro resultado positivo e/ou a detecção de perfis de seroconversão pelo teste de *Western Blot*, após resultados negativos em amostras anteriores.

A população seleccionada foi posteriormente caracterizada com base na recolha de informação epidemiológica e demográfica relativamente a variáveis como: género, idade, naturalidade, consumo de drogas injectáveis e viagens/estadias fora de Portugal.

2. Colheita, Selecção e Preparação de Amostras

No período de tempo compreendido entre 11 de Maio e 30 de Outubro de 2006 a Unidade de Retrovírus recebeu amostras de sangue correspondentes a 70 indivíduos toxicodependentes infectados pelo VIH-1, colhidas em tubo Sarstedt Manovette® com anti-coagulante (EDTA), acompanhadas por uma folha de inquérito (ver anexo II). Do total recebido, 46 amostras respeitaram os critérios de inclusão estabelecidos e foram seleccionadas para o estudo.

O processamento das amostras foi realizado com o objectivo de extrair ADN genómico celular. Para tal, o sangue foi submetido a uma centrifugação de 2500 xg durante dez minutos à temperatura ambiente para, posteriormente se proceder à recolha do *buffy coat* (fase de separação intermédia onde os leucócitos se encontram concentrados). A extracção do ADN foi efectuada pelo método de coluna a partir do *buffy coat*, utilizando-se o kit *QIAamp DNA* (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo as indicações do fabricante.

Para confirmação das condições e da concentração do ADN extraído as amostras foram sujeitos a uma electroforese em gel de agarose a 1% (corrida: 90 volts; 1 hora). O gel foi fotografado sob luz ultravioleta, após contrastação com uma solução de brometo de etídio ($0,5\mu\text{gml}^{-1}$).

3. Amplificação das Regiões Genómicas Virais

Para classificação das variantes genotípicas dos casos de infecção por VIH-1 estudados foram analisadas duas regiões do genoma proviral. A escolha das duas regiões genómicas virais (*env* e *gag*) teve em consideração a elevada diversidade do VIH-1 descrita na população portuguesa assim como a existência de múltiplos subtipos virais em circulação.

3.1 Amplificação do Gene *env*

A partir das amostras de ADN genómico extraído foi amplificada por *Nested PCR* uma região do gene *env* utilizando os *primers* descritos por Delwart *et al*, 1993⁸⁶. Na primeira amplificação foi obtido um fragmento com 1200 pb utilizando o par de *primers* externos ED5 e ED12 (posições nucleotídicas 6557-6582 e 7782-7811 no isolado VIH-1_{HXB2}). Os produtos de PCR foram submetidos a uma segunda amplificação, utilizando-se o par de *primers* internos ES7 e ES8 (posições nucleotídicas 6983-7021 e 7686-7648 no isolado VIH-1_{HXB2}) e obteve-se um fragmento com 665 pb. As condições de reacção nas duas amplificações foram as seguintes: tampão de PCR a 1x, MgCl₂ a 1,5 mM, dNTPs a 0,2 mM, *primers* a 0,3 µM e enzima *AmpliTaq Gold* a 1,25U (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Na primeira reacção de amplificação foi adicionado 0,5 µg de ADN à mistura de reacção; na segunda amplificação foi adicionado 2 µl do produto obtido na reacção anteriormente processada. O programa de amplificação para a primeira reacção de PCR iniciou-se com uma desnaturação a 94°C durante 9 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 1minuto, *annealing* a 50°C durante 45 segundos e síntese a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos) e de uma extensão final dos produtos a 72°C durante 7 minutos. O programa para a segunda

reacção de amplificação foi mantido com excepção da temperatura de *annealing*, que subiu para 53°C.

3.2 Amplificação do Gene *gag*

Para amplificação da região do gene *gag* recorreu-se igualmente à técnica de *Nested PCR*. Os *primers* escolhidos foram descritos por Heyndrickx *et al*, 2000⁸⁷. Na primeira amplificação foi obtido um fragmento com 1097 pb utilizando o par de *primers* externos H1G777 e H1P202 (posições nucleotídicas 1231-1255 e 2328-2352 no isolado VIH-1_{HXB2}). Na segunda amplificação obteve-se um fragmento com 805 pb utilizando-se o par de *primers* internos H1G822 e H1GHMA1317 (posições nucleotídicas 1276-1298 e 2078-2103 no isolado VIH-1_{HXB2}). Em casos de insucesso na amplificação foi também utilizado o par de *primers* internos alternativo, H1Gag1584 e g17 (posições 1577-1595 e 2017-2040 do isolado VIH-1_{HXB2}), obtendo-se um fragmento com cerca de 445 pb. As condições de reacção foram as mesmas que as utilizadas na amplificação da região do gene *env*. O programa de amplificação para a primeira reacção iniciou-se com uma desnaturação a 94°C durante 9 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 50°C durante 30 segundos e síntese a 68°C durante 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final dos produtos a 68°C durante 7 minutos. Em casos excepcionais e por dificuldades de amplificação de algumas amostras, as condições da primeira amplificação foram alteradas, sendo a desnaturação inicial seguida por um prévio conjunto de cinco ciclos com uma temperatura de *annealing* mais baixa (desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 37°C durante 45 segundos e síntese a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos) para aumento da sensibilidade da técnica na detecção destes vírus. O

programa da segunda amplificação divergiu no número de ciclos (de $n=40$ para $n=35$), no passo de síntese (de 68°C durante 1 minuto e 30 segundos para 72°C durante 1 minuto) e na temperatura da extensão final que decorreu a 72°C (em vez de 68°C). Quando utilizado o par de *primers* alternativos (H1Gag1584 e g17) as condições de amplificação da segunda reacção foram uma prévia desnaturação a 94°C durante 9 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 50°C durante 45 segundos e síntese a 72°C durante 1 minuto) e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

3.3 Visualização dos Produtos Finais

Os fragmentos finais amplificados a partir de *env* e *gag* por *Nested PCR* foram sujeitos a uma electroforese em gel de agarose a 1,7% (corrida: 100 volts; 1 hora e 30 minutos) e visualizados sob luz ultravioleta, após contrastação com brometo de etídio ($0,5\mu\text{gml}^{-1}$). Para confirmar a amplificação dos fragmentos esperados foi utilizado na electroforese o marcador de massa molecular 50 pb (*New England Biolabs, Ipswich*).

4. Purificação e Sequenciação dos Produtos Amplificados

Os produtos obtidos na segunda reacção de amplificação foram purificados através do método de coluna, utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* seguindo as indicações do fabricante (*QIAGEN, Valencia, CA*). Para confirmação da eliminação do excesso de *primers* e dNTPs presentes nos produtos de PCR e a sua concentração (análise qualitativa), uma alíquota ($2\mu\text{L}$) de cada produto purificado foi observada após electroforese em gel de agarose a 1,7% (corrida: 100 volts, 1 hora e 30 minutos), juntamente com o marcador de massa molecular VIII (*Roche*,

Roche Diagnostics, Germany). As amostras em gel foram visualizadas sob luz ultravioleta após contrastação numa solução de brometo de etídio ($0.5\mu\text{gml}^{-1}$).

O método de sequenciação aplicado foi o de terminação em cadeia. Assim, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma sequenciação cíclica, utilizando-se os *primers* internos das respectivas reacções de amplificação e o kit *Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, seguindo as instruções do fabricante (*PE Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA*). No caso da região *env* foi utilizado um *primer* interno adicional para sequenciação, ED33 (posições nucleotídicas 7381-7360 no isolado HIV-1_{HXB2}). A sequenciação cíclica decorreu ao longo de 25 ciclos, cada constituído pelos passos de desnaturação a 96°C durante 30 segundos, *annealing* a 50°C durante 15 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos.

Os produtos da sequenciação cíclica foram entregues à Unidade Laboratorial de Utilização Comum (ULUC) do INSA, responsável pelo processo de electroforese capilar das amostras e envio das sequências nucleotídicas para o laboratório. A partir destas sequências foi construída a sequência consenso para cada região estudada (*gag* e *env*) e para cada amostra estudada, utilizando o programa ClustalW e BioEdit vs 7.0.5.3. Estas sequências foram denominadas genericamente de TX - toxicodependentes.

5. Sequências *gag* e *env*

5.1 Análise por BLAST

As sequências consenso correspondentes às duas regiões amplificadas foram submetidas à análise por BLAST, utilizando a base de dados de sequências de VIH

de *Los Alamos* (<http://www.hiv.lanl.gov>). Esta análise forneceu uma potencial classificação das variantes genotípicas obtidas em acordo com cada região e para de cada um dos casos estudados. Estes resultados foram tidos em linha de conta para apoiar a escolha de sequências referência a incluir na posterior análise filogenética.

5.2 Análise Filogenética

O estudo filogenético foi baseado na análise dos agrupamentos formados com as sequências referência e nas informações epidemiológicas e demográficas recolhidas relativas aos diferentes casos de infecção incluídos neste estudo. Estes resultados permitiram a comparação da classificação das sequências para as duas regiões genómicas nos dois grupos de indivíduos estudados (infecções VIH-1 antigas vs infecções VIH-1 recentes). Utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al*, 1994)⁸⁸ as sequências Tx de cada região genómica foram alinhadas com sequências referência disponíveis e representativas de vários subtipos e formas genéticas do VIH-1, assim como sequências provenientes de isolados de diferentes regiões geográficas. Na construção das árvores filogenéticas foi utilizado o método de *Neighbour Joining*⁸⁹. As distâncias genéticas foram estimadas através da construção de uma matriz com base no modelo de *Kimura* a dois parâmetros. A análise de robustez da topologia das árvores foi feita por *bootstrapping*, com base em 1000 réplicas. Os agrupamentos foram considerados válidos quando os valores de *bootstrap* eram iguais ou superiores a 70%. Todos estes métodos estão incluídos no programa MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2004).

5.3 Análise por *bootscanning*

No caso da classificação ambígua de sequências TX por filogenia, estas foram analisadas com maior detalhe através de *bootscanning*, no sentido de procurar a ocorrência de eventos de recombinação ao longo do gene e esclarecer quais as formas genómicas do VIH-1 envolvidas. Para tal utilizou-se o programa SimPlot versão 3.5.1⁹⁰, (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot>). Num primeiro passo foi utilizada a ferramenta *Viral Genotyping Tool*, (www.ncbi.nlm.nih.gov) para determinar quais as potenciais formas genéticas que participaram nos eventos de recombinação. Posteriormente foi construído um novo ficheiro no formato FASTA com sequências referência representativas dos vários subtipos e formas genéticas dando particular ênfase às variantes determinadas como potenciais participantes nos eventos de recombinação. Este ficheiro é submetido à análise por Simplot onde são determinadas quais as variantes genéticas (e quais as sequências mais semelhantes com as originalmente envolvidas) que participaram nos eventos recombinantes. Por fim é realizado o *bootscanning* das sequências que nos dá a informação acerca dos eventos de recombinação assim como do número de eventos de *crossing over* e tamanho aproximado dos fragmentos que compõem o mosaico génico.

5.4 Sequências Referência

As sequências referência utilizadas na construção das árvores filogenéticas possuíam o genoma sequenciado na sua totalidade e representavam todos os subtipos descritos e CRFs relevantes na pandemia VIH/SIDA. Os respectivos nomes e números de acesso na base de dados *GenBank* são os seguintes: CM240, U54771; 90CF402, U5118; IBNG, L39106; DJ264, AF063224; 02UZ693, AY829204; 01CM_0002BBY, AY371122; KAL153, AF193276; RU98001, AF193277; GR84,

AF119819; 94CY032, AF049337; VI961, AF076998; X492, AY227107; EE0359, AY535659; 04RU001, DQ400856; 97SE1078, AJ288981; p03GH173, AB286851; 97CN001, AF286226; 98CN009, AF286230; 98CN006, AF286229; 97CNGX_6F, AY008715; 96TZ_BF061, AF289548; 96TZ_BF071, AF289549; ARMA159, AF385936; A32989, AF408630; 96CM_1849, AF460972; 96CM_4164, AF460974; X605, AF450096; X421, AF423757; 9196/01, AY882421; X623, AF450097; 99TH_MU2079, AF516184; 02TH_OUR1331, AF529572; CU29, AY588971; CU38, AY588970; 01UADN139, DQ823357; 98UA0116, AF413987; 97CDKTB48, AF286238; 94CY017, AF286237; HXB2, AF033819; MN, AF075719; OYI, M26727; JRFL, U63632; RF HAT3, M17451; ETH2220, U46016; IN21068, AF067155; NDK, A34828; ELI, A07108; 93BR020, AF005494; FIN9363, AF075703; CMMP255, AJ249236; 95CM-MP257, AJ249237; 92NG083, U88826; SE6165, AF061642; HH8793, AF061640; DRCL, AF084936; 90CR056, AF005496; VI991, AF190127; SE9280, AF082394; SE91733, AF082395; MP535, AJ249239; EQTB11C, AJ249235; ANTSIVcpz, U42720.

6. Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi feito recorrendo-se o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), utilizando-se o teste estatístico *two tailed Fisher's exact test* cujo valor α escolhido foi de 0,05%. Este teste foi utilizado para verificar se existiam diferenças entre o número de casos de infecção classificados como subtipos B e não B entre os dois grupos populacionais estudados. O tratamento estatístico foi realizado com o apoio do núcleo de estatística do Observatório Nacional de Saúde do INSA.

Resultados

A informação recolhida à data de colheita permitiu caracterizar epidemiologicamente os 46 indivíduos inseridos no estudo, separadamente para cada um dos grupos definidos (anexo III).

1. Caracterização Epidemiológica do Grupo Infecções VIH-1 Antigas

Neste grupo foram incluídos 25 toxicodependentes, dos quais 21 (84%) pertenciam ao género masculino e 4 (16%) ao género feminino. O intervalo de idades foi de 29 a 54 anos, sendo a média de 38,6 anos e a mediana de 38 anos de idade.

Dos dados demográficos recolhidos verificou-se que a maioria (n=24; 96%) dos indivíduos era natural de Portugal e apenas um indivíduo (TX48) era imigrante, oriundo dos EUA. A maioria (n=16; 64%) refere deslocações e estadias fora de Portugal enquanto 9 (36%) indivíduos declararam nunca terem saído do país. Entre os 16 casos, 13 (81%) visitaram países da Europa Ocidental e Central e 3 (19%) viveram e/ou deslocaram-se respectivamente para os EUA (TX48), para Angola (TX54) e para a Ásia Oriental (TX55).

Da recolha de dados sobre o consumo de drogas por via intravenosa, 22 (88%) indivíduos referiram consumo de heroína e cocaína, enquanto os restantes 3 (12%) apenas referiram o consumo de heroína. Relativamente à duração do consumo, em 22 (88%) dos casos foi superior a 6 anos, enquanto que em 3 (12%) indivíduos foi inferior ou igual a 5 anos. À data de colheita de amostras observou-se que 8 (32%) indivíduos ainda mantinham o consumo de drogas.

O ano provável em que os indivíduos adquiriram a infecção por VIH-1 foi o principal critério utilizado para a sua inclusão no grupo de estudo. Verificou-se que o ano de infecção mais frequente foi o de 1998, correspondendo a 7 indivíduos,

com um período de tempo de infecção de 8 anos. Seis indivíduos adquiriram a infecção no ano de 1994 (tempo de infecção de 12 anos), três no ano de 1995 (tempo de infecção de 11 anos), quatro no ano de 1996 (tempo de infecção de 10 anos) e cinco no ano de 1997 (tempo de infecção de 9 anos) (Tabela 1).

Tabela 1: Ano e tempo de infecção por caso incluído no grupo Infecções VIH-1 Antigas

Caso	Ano de Infecção	Tempo de infecção em anos (à data de colheita)
TX7	1997	9
TX8	1998	8
TX9	1998	8
TX12	1994	12
TX16	1996	10
TX17	1997	9
TX20	1994	12
TX21	1996	10
TX22	1997	9
TX23	1998	8
TX27	1996	10
TX31	1994	12
TX32	1994	12
TX34	1995	11
TX40	1995	11
TX45	1998	8
TX48	1994	12
TX49	1998	8
TX50	1998	8
TX54	1998	8
TX55	1997	9
TX57	1994	12
TX59	1995	11
TX60	1996	10
TX63	1997	9

2. Caracterização Epidemiológica do Grupo Infecções VIH-1 Recentes

Este grupo incluiu 21 toxicodependentes, dos quais 15 (71%) pertenciam do género masculino e seis (29%) do género feminino. O intervalo de idades foi de 23 a 51 anos, com uma média de 36,9 anos e uma mediana de 37 anos de idade.

A maioria (n=18; 86%) dos indivíduos era natural de Portugal e apenas 3 (14%) eram imigrantes, respectivamente de Marrocos (TX37), de Moçambique (TX43) e de Cabo Verde (TX13). A maioria (n=12, 57%) dos indivíduos refere deslocações e estadias fora de Portugal em oposição a 9 (43%) indivíduos que declararam nunca terem saído do país. Entre os 12 (57%) casos afirmativos, as deslocações referidas foram dentro da Europa Ocidental (n=10; 83%) e para o Norte de África (n=2; 17%).

Sobre o consumo de drogas por via intravenosa, observou-se que a maioria (n=18;86%) consumiu heroína e cocaína. Dois casos (9%) reportaram o consumo de heroína e um caso (5%) apenas o de cocaína. Na análise sobre o período de tempo de consumo, verificou-se que 9 indivíduos (43%) consumiram estes estupefacientes até uma duração de 5 anos e 9 (43%) durante mais de 6 anos (três indivíduos não responderam a esta questão). Quando questionados acerca do consumo à data de colheita, 6 (28%) indivíduos afirmaram ainda consumir este tipo de estupefacientes.

Relativamente à aquisição e período de tempo de infecção por VIH-1, observou-se que 7 casos correspondiam a infecções adquiridas em 2004 (tempo de infecção de 2 anos), 12 casos em 2005 (tempo de infecção de 1 ano) e 2 casos em 2006 (tempo de infecção inferior a um ano) (Tabela 2).

Tabela 2: Ano e tempo de infecção por caso incluído no grupo Infecções VIH-1 Recentes

Caso	Ano de Infecção	Tempo de infecção em anos (à data de colheita)
TX5	2004	2
TX11	2005	1
TX13	2005	1
TX14	2004	2
TX15	2005	1
TX18	2006	<1
TX19	2004	2
TX28	2004	2
TX30	2005	1
TX33	2004	2
TX37	2005	1
TX41	2004	2
TX43	2005	1
TX46	2004	2
TX47	2005	1
TX51	2005	1
TX52	2005	1
TX56	2006	<1
TX61	2005	1
TX69	2005	1
TX70	2005	1

3. Obtenção, Identificação e Submissão das Sequências TX

Na análise do gene *env* foi possível amplificar parte da região codificante para a gp120 a partir da totalidade das amostras de ADN genómico em estudo. Estas amostras foram igualmente sujeitas à amplificação de parte da p24, codificada por *gag*. Com excepção de um caso (TX19), correspondente a um indivíduo incluído no grupo Infecções VIH-1 Recentes, todas as amostras foram amplificadas com sucesso para ambas regiões em estudo. Os fragmentos amplificados por Nested PCR foram purificados, visualizados em gel de agarose (Fig.7) e sujeitos a uma reacção de sequenciação cíclica para posterior análise das sequências nucleotídicas.

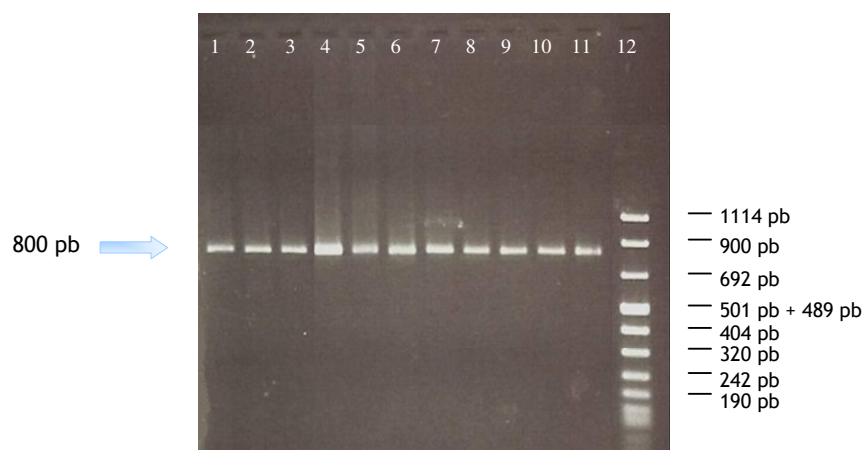


Fig.7: Produtos purificados obtidos através da amplificação do gene *gag*, visualizados em gel de agarose. Nas colunas 1 a 11 foram aplicadas onze das 46 amostras estudadas. Na coluna 12 foi aplicado o marcador de massa molecular VIII (Roche Applied Science).

Da análise de todas as sequências obtidas para cada região analisada, para cada caso, obteve-se as sequências consenso, codificadas com a mesma terminologia (TXn) para definir cada caso incluído no estudo.

Estas sequências consenso foram submetidas na base de dados GenBank, tendo-lhe sido atribuído os seguintes números de acesso: TX5, EF513520 (*gag*) e EF513564 (*env*); TX11, EF513524 (*gag*) e EF513568 (*env*); TX13, EF513526 (*gag*) e EF513570 (*env*); TX14, EF513527 (*gag*) e EF513571 (*env*); TX15, EF513528 (*gag*) e EF513572 (*env*); TX18, EF513531 (*gag*) e EF513575 (*env*); TX19 EF513576 (*env*); TX28, EF513537 (*gag*) e EF513582 (*env*); TX30, EF513538 (*gag*) e EF513583 (*env*); TX33, EF513541 (*gag*) e EF513586 (*env*); TX37, EF513543 (*gag*) e EF513588 (*env*); TX41, EF513545 (*gag*) e EF513590 (*env*); TX43, EF513546 (*gag*) e EF513591 (*env*); TX46, EF513548 (*gag*) e EF513593 (*env*); TX47, EF513549 (*gag*) e EF513594 (*env*); TX51, EF513552 (*gag*) e EF513597 (*env*); TX52, EF513553 (*gag*) e EF513598 (*env*); TX52, EF513553 (*gag*) e EF513598 (*env*); TX56, EF513556 (*gag*) e EF513601 (*env*); TX61, EF513560 (*gag*) e EF513605 (*env*); TX69, EF513562 (*gag*) e EF513607 (*env*); TX70, EF513563 (*gag*) e EF513608 (*env*); TX7, EF513521 (*gag*) e EF513565 (*env*); TX8, EF513522 (*gag*) e EF513566 (*env*); TX9, EF513523 (*gag*) e EF513567 (*env*); TX12, EF513525 (*gag*) e EF513569 (*env*); TX16, EF513529 (*gag*) e EF513573 (*env*); TX17, EF513530 (*gag*) e EF513574 (*env*); TX20, EF513532 (*gag*) e EF513577 (*env*);

TX21, EF513533 (*gag*) e EF513578 (*env*); TX22, EF513534 (*gag*) e EF513579 (*env*); TX23, EF513535 (*gag*) e EF513580 (*env*); TX27, EF513536 (*gag*) e EF513581 (*env*); TX31, EF513539 (*gag*) e EF513584 (*env*); TX32, EF513540 (*gag*) e EF513585 (*env*); TX34, EF513542 (*gag*) e EF513587 (*env*); TX40, EF513544 (*gag*) e EF513589 (*env*); TX45, EF513547 (*gag*) e EF513592 (*env*); TX49, EF513550 (*gag*), EF513595 (*env*); TX50, EF513551 (*gag*), EF513596 (*env*); TX54, EF513554 (*gag*), EF513599 (*env*); TX55, EF513555 (*gag*), EF513600 (*env*); TX57, EF513557 (*gag*), EF513602 (*env*); TX59, EF513558 (*gag*), EF513603 (*env*); TX60, EF513559 (*gag*), EF513604 (*env*); TX63, EF513561 (*gag*), EF513606 (*env*).

4. Estudo das Sequências TX

Numa primeira abordagem todas as sequências consenso TX foram sujeitas a uma prévia análise por BLAST, utilizando a base de dados para o VIH-1 de Los Alamos.

No grupo Infecções VIH-1 Antigas (n=25) verificou-se que, em 19 (76%) casos houve concordância entre as potenciais classificações obtidas em *gag* e *env*: 15 (60%) sequências foram classificadas como subtipo B e 4 (16%) reconhecidas como mais semelhantes às sequências classificadas com CRF14_BG. Relativamente às restantes 6 (24%) sequências TX, a análise por BLAST sugere que estas possam ser recombinantes de segunda geração entre CRFs e subtipos puros: 5 (83%) sequências semelhantes às CRF14_BG em *gag* e G em *env* e 1 (17%) sequências semelhantes à CRF12_BF em *gag* e B em *env* (Tabela 3).

No grupo Infecções VIH-1 Recentes (n=21) a discordância das classificações entre duas regiões estudadas foi maior que no grupo anterior, sugerindo a existência de um maior número de formas geneticamente recombinadas. Foi observada concordância de classificações para 9 (43%) sequências TX: 3 (14%)

sequências foram mais semelhantes com o subtipo B, 4 (19%) com a CRF02_AG e 2 (10%) com a CRF14_BG. Para a sequência TX19 foi apenas analisada o gene *env*, apresentando uma maior semelhança com sequências classificadas como subtipo G. Para as restantes 10 sequências TX foi sugerido tratarem-se de formas recombinantes, observando-se 1 caso de recombinação entre subtipos puros (B em *gag* e A em *env*), 7 casos de recombinação entre subtipos puros e CRFs (CRF14_BG em *gag* e G em *env*; CRF14_BG em *gag* e B em *env*; B em *gag* e CRF02_AG em *env*) e 3 casos de recombinação entre diferentes CRFs (CRF14_BG em *gag* e CRF02_AG em *env*; cpx0206 em *gag* e CRF02_AG em *env*) (Tabela 3).

Esta prévia classificação por BLAST foi tida em linha de conta na escolha das sequências referência a utilizar na posterior análise filogenética das sequências TX obtidas no presente estudo.

Tabela 3: Classificação por BLAST das sequências TX por caso e região genômica analisada.

A

Sequência TX (VIH-1 Antigas)	Análise por BLAST	
	<i>gag</i>	<i>env</i>
TX7	B	B
TX8	CRF14_BG	G
TX9	B	B
TX12	CRF14_BG	CRF14_BG
TX16	B	B
TX17	CRF14_BG	CRF14_BG
TX20	B	B
TX21	B	B
TX22	CRF14_BG	G
TX23	CRF14_BG	G
TX27	B	B
TX31	CRF12_BF	B
TX32	CRF14_BG	CRF14_BG
TX34	B	B
TX40	B	B
TX45	CRF14_BG	CRF14_BG
TX48	CRF14_BG	G
TX49	CRF14_BG	G
TX50	B	B
TX54	B	B
TX55	B	B
TX57	B	B
TX59	B	B
TX60	B	B
TX63	B	B

B

Sequência TX (VIH-1 Recentes)	Análise por BLAST	
	<i>gag</i>	<i>env</i>
TX5	CRF14_BG	G
TX11	CRF14_BG	CRF14_BG
TX13	CRF02_AG	CRF02_AG
TX14	CRF14_BG	G
TX15	Cpx_0206	CRF02_AG
TX18	B	B
TX19	-	G
TX28	CRF14_BG	G
TX30	CRF14_BG	B
TX33	CRF14_BG	G
TX37	B	A
TX41	CRF02_AG	CRF02_AG
TX43	B	B
TX46	CRF02_AG	CRF02_AG
TX47	CRF14_BG	B
TX51	B	CRF02_AG
TX52	CRF02_AG	CRF02_AG
TX56	CRF14_BG	CRF02_AG
TX61	CRF14_BG	CRF02_AG
TX69	B	B
TX70	CRF14_BG	CRF14_BG

A - grupo Infecções VIH-1 Antigas; B - grupo Infecções VIH-1 Recentes

Na análise filogenética das sequências TX foram utilizadas 62 sequências referência publicadas e disponíveis em base de dados, representativas de diferentes subtipos e formas geneticamente recombinadas. Na construção da árvore foi utilizada como *outgroup* a sequência ANTSIVcpz, obtida a partir de uma estirpe isolada num chimpanzé no Congo.

Numa primeira fase as sequências TX foram analisadas separadamente por grupo (Infecções VIH-1 Antigas e Infecções VIH-1 Recentes) e por região genómica (*gag* e *env*). Posteriormente, as sequências dos dois grupos foram analisadas em conjunto para cada região genómica, de modo a verificar a ocorrência, ou não, de relações filogenéticas entre as sequências estudadas.

4.1 Classificação Molecular das Infecções VIH-1 Antigas

a) **Região *gag*:** Na construção da árvore filogenética foram comparados fragmentos nucleotídicos com 802 pb correspondentes a 25 sequências TX e às sequências referência seleccionadas.

Os agrupamentos correspondentes aos subtipos e formas geneticamente recombinantes do VIH-1, representadas pelas sequências referência, apresentaram-se robustos e bem definidos na topologia da árvore, sendo suportados por valores de *bootstrap* superiores a 70% (Fig.8).

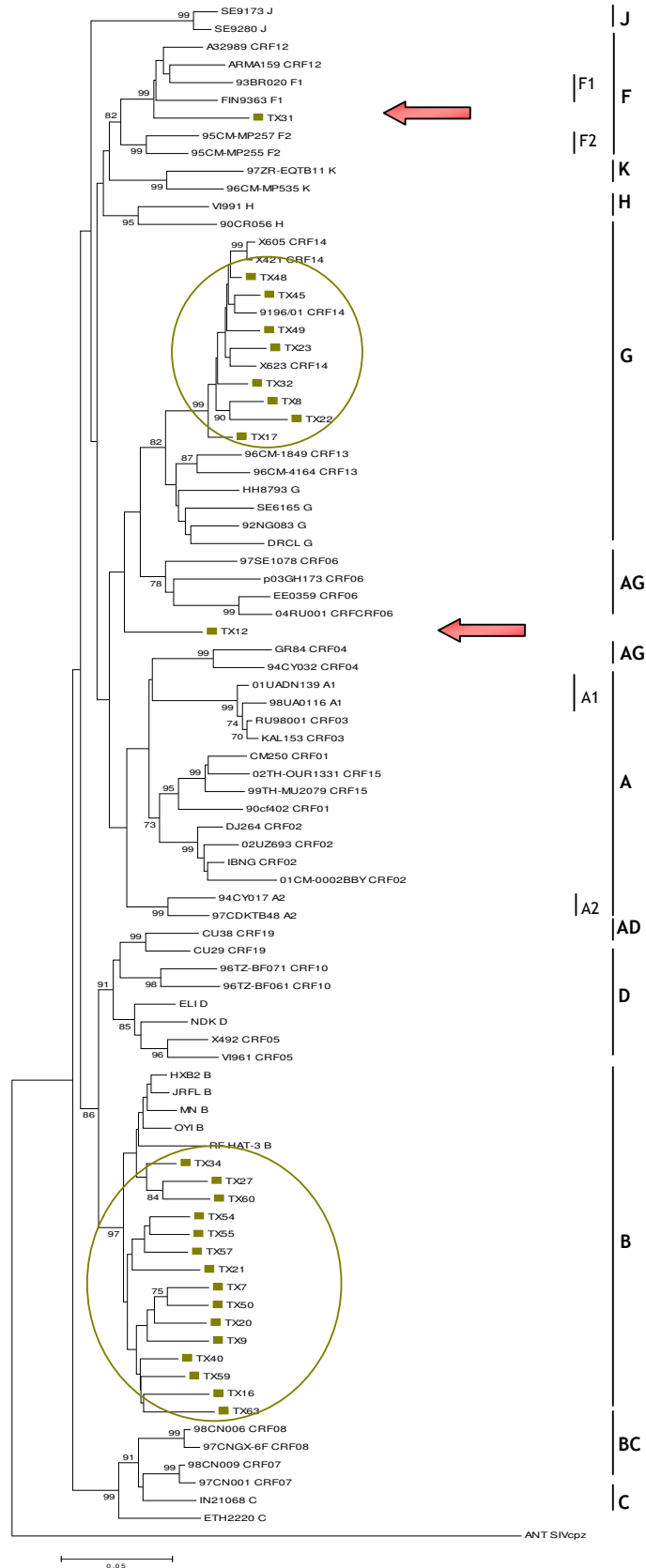


Fig.8: Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Antigas com base na região *gag*. A análise por *bootstrap* foi feita com 1000 réplicas e os valores acima de 70% encontram-se representados na árvore. As sequências TX estão salientadas por círculos e setas coloridos.

Verificámos que 15 (60%) sequências TX foram filogeneticamente classificadas como vírus do subtipo B (TX7, TX9, TX16, TX20, TX21, TX27, TX34, TX40, TX50, TX54, TX55, TX57, TX59, TX60 E TX63) e 10 (40%) como outras formas virais que não B (Fig.9).

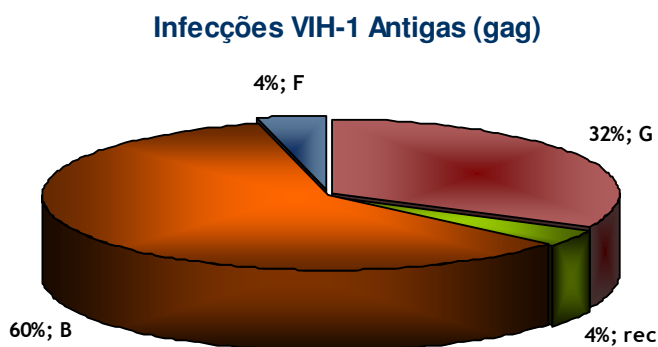


Fig.9: Distribuição das sequências TX do grupo das Infeções VIH-1 Antigas consoante a sua classificação com base na região *gag*. O nome “rec” designa recombinante.

Entre estas últimas, a sequência TX31 agrupou com sequências do subtipo F, com um elevado valor de *bootstrap* (99%) e oito sequências TX (TX48, TX45, TX49, TX23, TX32, TX8, TX22 e TX17) agruparam dentro do *cluster* para o subtipo G com as sequências referência para a CRF14_BG, agrupamento este suportado por um valor de *bootstrap* de 97%.

Não foi possível classificar de uma forma clara a sequência TX12 recorrendo à inferência filogenética. Esta sequência isolou-se claramente de qualquer agrupamento de subtipos ou formas geneticamente recombinadas na árvore, indicando a possível existência de recombinação intragénica em *gag*. Esta hipótese foi testada através da análise por *Bootscanning*. A ferramenta *Viral Genotyping Tool* revelou que as formas genéticas mais prováveis de estarem envolvidas nos eventos de recombinação eram o subtipo B e a CRF14_BG. Consequentemente, na construção do ficheiro para análise de *bootscanning* foram incluídas, além de uma

sequência referência representativa para cada subtipo e CRFs relevantes na pandemia VIH/SIDA, cinco sequências referência para o subtipo B e quatro sequências referência para a CRF14_BG. Tendo em conta que a região *gag* da CRF14_BG provém do subtipo G, foram incluídas três sequências adicionais para este subtipo. Por *bootscanning* verificou-se que ocorreu um evento de recombinação e que a sequência TX12 é constituída por um primeiro segmento, com aproximadamente 320pb, classificado como subtipo B e por um segundo segmento, com aproximadamente 350 pb, classificado como CRF14_BG (Fig.10).

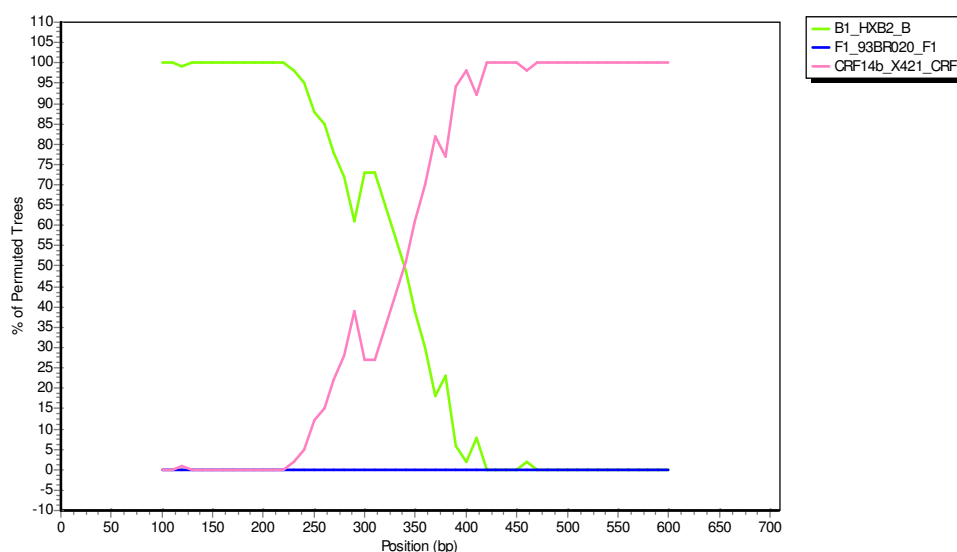


Fig.10: Análise por *Bootscanning* para identificação de pontos de recombinação intragénica em *gag* da sequência TX12. Os subtipos e/ou CRFs referência utilizados na análise estão indicados na legenda do gráfico.

b) Região *env*: Na análise filogenética da região *env* foram comparados fragmentos com 528 pb de 25 sequências TX e de 62 sequências referência. Verificou-se que as diferentes formas genéticas classificadas para o VIH-1, representadas pelas sequências referência, formaram agrupamentos claros e distintos, suportados por elevados valores de *bootstrap* (Fig.11).

O agrupamento definido para o subtipo B foi bastante robusto, apoiado por um valor de *bootstrap* de 95%. As sequências TX12, TX17, TX32 e TX45 agruparam de forma bastante robusta (99%) com as sequências referência para a CRF14_BG de origem espanhola. As sequências TX31 e TX63 agruparam igualmente com a sequência referência CRF14_BG isolada a partir de um indivíduo infectado em Portugal. Contudo, este grupo foi suportado por um baixo valor de *bootstrap*. As sequências TX7, TX9, TX20, TX50, TX54 e TX59 formaram um agrupamento isolado dentro do subtipo B, apoiado por um valor de *bootstrap* de 72%. Igualmente classificadas como subtipo B, as sequências TX16 com TX40 e as sequências TX34 com TX60 formaram agrupamentos isolados. As restantes sequências TX (TX21, TX27, TX55 e TX57) distribuem-se de uma forma mais dispersa dentro do grupo para o subtipo B.

As cinco sequências TX classificadas como subtipo G (TX8, TX22, TX23, TX48 e TX49) formaram um agrupamento distinto e isolado de todas as sequências referência representativas para este subtipo, suportado por um valor de *bootstrap* de 97%.



Ana Filipa Silva

Consequentemente, na análise geral observou-se que 20 (80%) sequências TX foram filogeneticamente classificadas como subtipo B, enquanto as restantes 5 (20%) integraram o grupo definido para o subtipo G (Fig.12).

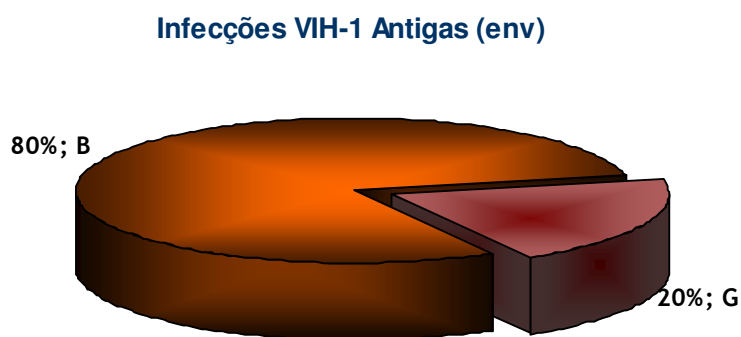


Fig. 12: Distribuição das sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Antigas, consoante a sua classificação com base na região *env*.

c) Regiões *gag* e *env*: Os resultados da classificação das sequências TX para as duas regiões estudadas foram comparados. Das 25 sequências classificadas filogeneticamente e por *Bootscanning*, observou-se que 20 (80%) casos mostraram uma concordância entre as classificações obtidas separadamente para cada região analisada. Entre estas sequências, classificadas como subtipos puros, 15 (75%) pertencem ao subtipo B e 5 (25%) ao subtipo G. Apenas cinco (20%) casos foram considerados recombinantes: um caso (TX12) foi classificado como recombinante intragénico CRF14_BG/B em *gag* e como B em *env*; TX31 foi classificado como F em *gag* e B em *env*; TX17, TX32 e TX45 foram classificados como G em *gag* e B em *env*, agrupando para ambas regiões genómicas com sequências referência para a CRF14_BG (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação por inferência filogenética e *bootscanning* das sequências TX do grupo das Infecções VIH Antigas com base nas regiões genómicas *gag* e *env* do VIH-1.

Caso	Classificação Sequências		
	Subtipo <i>gag</i>	Subtipo <i>env</i>	Subtipo <i>gag+env</i>
TX7	B	B	B
TX8	G	G	G
TX9	B	B	B
TX12	CRF14_BG/B	B	CRF14_BG/B
TX16	B	B	B
TX17	G	B	BG
TX20	B	B	B
TX21	B	B	B
TX22	G	G	G
TX23	G	G	G
TX27	B	B	B
TX31	F	B	BF
TX32	G	B	BG
TX34	B	B	B
TX40	B	B	B
TX45	G	B	BG
TX48	G	G	G
TX49	G	G	G
TX50	B	B	B
TX54	B	B	B
TX55	B	B	B
TX57	B	B	B
TX59	B	B	B
TX60	B	B	B
TX63	B	B	B

4.2 Classificação Molecular das Infecções VIH-1 Recentes

a) **Região *gag*:** Para a análise filogenética da região *gag* foram comparados fragmentos com 711 pb obtidos a partir das 62 sequências referência e de 20 sequências TX (com excepção da TX19 cuja região *gag* não foi possível amplificar) (Fig.13).

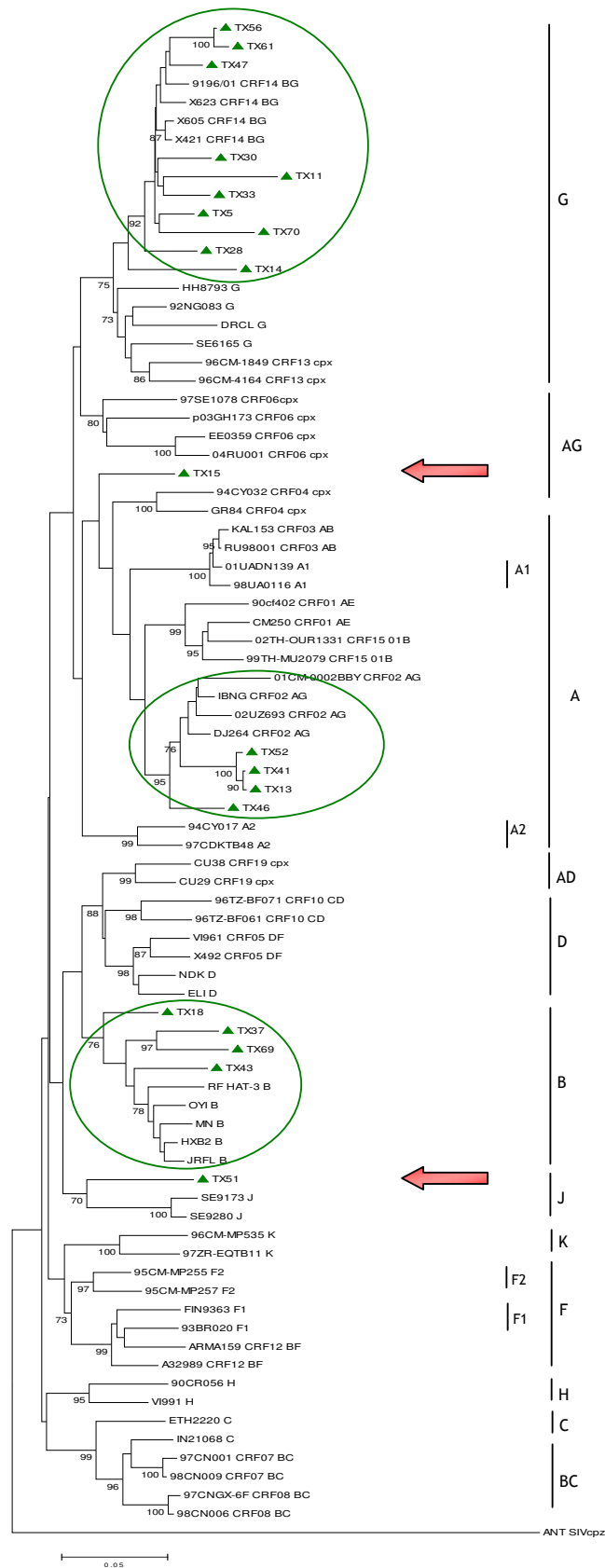


Fig.13: Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Recentes com base na região *gag*. A análise por *bootstrap* foi feita com 1000 réplicas e os valores acima de 70% encontram-se representados na árvore. As seqüências TX encontram-se assinaladas por círculos e setas coloridos.

Em acordo com a topologia da árvore, os agrupamentos em que foram incluídas as sequências TX, apresentam-se robustos e bem definidos, suportados por valores de *bootstrap* estatisticamente significativos (92% para a CRF14_BG, 95% para a CRF02_AG, 76% para o subtipo B e 70% para o subtipo J).

No âmbito geral, a classificação das sequências TX foi diversificada: 10 (50%) casos classificados como subtipo G, 4 (20%) casos como subtipo B, 4 (20%) casos como subtipo A e 1 (5%) caso como subtipo J (Fig.14).

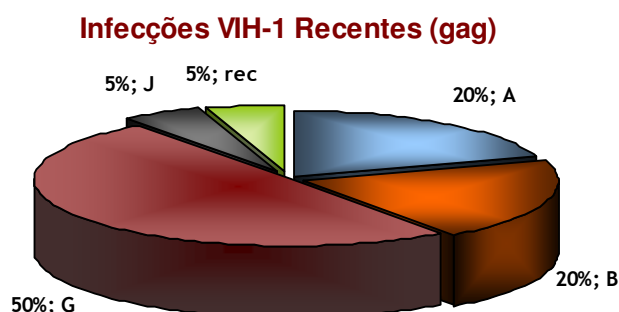


Fig.14: Distribuição das sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Recentes, consoante a classificação com base na região *gag*. O nome “rec” designa recombinante.

No agrupamento correspondente ao subtipo G, suportado por um valor de *bootstrap* de 75%, observou-se a inclusão das sequências TX5, TX11, TX14, TX28, TX30, TX33, TX47, TX56, TX61 e TX70. Com excepção de TX14, estas sequências TX formaram um *cluster* claro e robusto, suportado por um valor de *bootstrap* de 92%, com as sequências referência para a CRF14_BG.

Dentro do grupo definido para o subtipo B, suportado por um valor de *bootstrap* de 76%, agruparam as sequências TX18, TX37, TX43 e TX69.

As sequências TX13, TX41, TX46 e TX52 agruparam dentro do grupo formado para o subtipo A, formando um *cluster* isolado com as sequências referência para a CRF02_AG, apoiado por um valor de *bootstrap* de 95%.

A sequência TX51 agrupou com as sequências referência para o subtipo J, apoiada por um valor de *bootstrap* de 70%. Este valor foi o definido como mínimo em termos de interpretação da robustez da topologia da árvore. Através da utilização da ferramenta *Viral Genotyping Tool* verificou-se que esta sequência teria uma origem recombinante e as formas virais mais prováveis envolvidas pertenceriam aos subtipos J, D e B. Na construção do ficheiro para análise foram incluídas múltiplas sequências referência para estes subtipos, além de uma sequência referência representativa para os restantes subtipos e CRFs consideradas relevantes na pandemia VIH/SIDA. Contudo, a análise por Simplot mostrou que as sequências referência mais semelhantes com as intervenientes nos eventos de recombinação ocorridos em TX51 foram a MN (subtipo B) e a SE9280 (subtipo J) e que sequências do subtipo D no segmento analisado, não estariam envolvidas. Por *bootscanning* verificou-se a ocorrência de dois eventos de recombinação resultando num primeiro segmento com aproximadamente 220pb, classificado como subtipo B, num segundo segmento com cerca de 320 pb, classificado como subtipo J e num terceiro fragmento com aproximadamente 100 pb, classificado como subtipo B (Fig. 15).

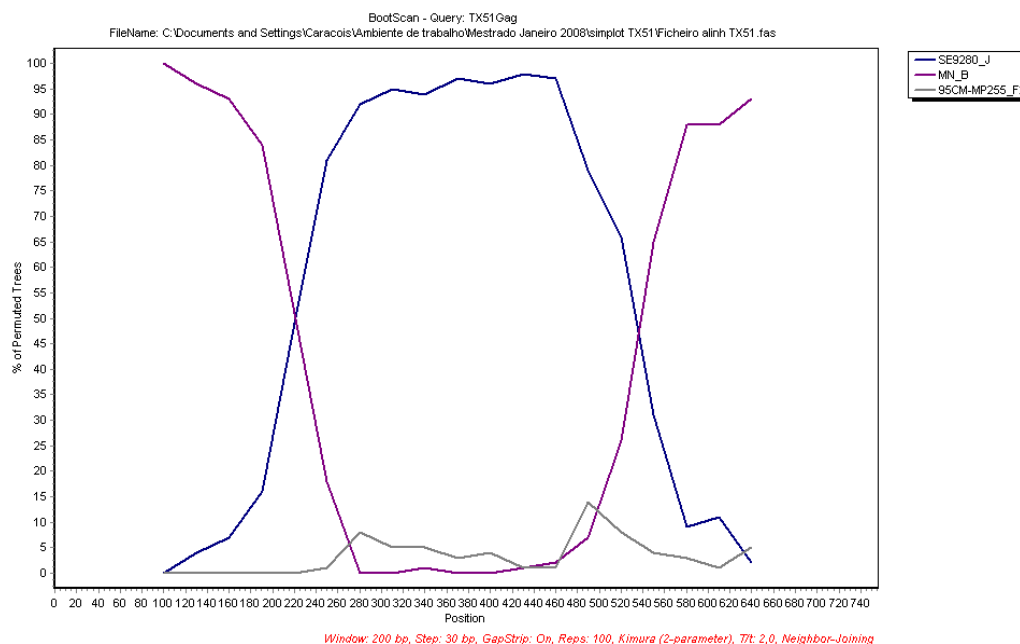


Fig. 15: Análise por *bootscanning* para identificação de eventos de recombinação intragênica em *gag* de TX51. Os subtipos e/ou CRFs referência na análise estão indicados na legenda do gráfico.

Relativamente à sequência TX15, cuja classificação filogenética indica tratar-se de um potencial recombinante, a sua localização na árvore mostra algum relacionamento filogenético com o subtipo A (em diferentes árvores TX15 ramifica ou a partir do grupo definido para o subtipo A ou a partir do ramo que dá origem aos recombinantes AG - dados não apresentados). Deste modo foram colocadas duas hipóteses: uma primeira, em que TX15 seria um dos sub-subtipos A3 ou A4, e uma segunda em que TX15 tratar-se-ia de um recombinante intragênico para esta região. As duas hipóteses foram testadas. A construção de uma nova árvore filogenética com a inclusão das sequências disponíveis para A3 e A4 (dados não apresentados) revelou que TX15 não era semelhante a qualquer um destes sub-subtipos e que a primeira hipótese não era verdadeira. TX15 foi analisada por *bootscanning* para verificar a existência ou não de recombinação intragênica. A ferramenta *Viral Genotyping Tool* revelou que as formas genéticas do VIH-1 com maior probabilidade de terem participado no(s) evento(s) de recombinação foram a

CRF02_AG e a CRF14_BG. Conhecendo a composição genômica destas CRFs, na construção do ficheiro para análise por *bootscanning* foram incluídas múltiplas sequências referência para os subtipos A, B, G, CRF02_AG e CRF14_BG, além de uma sequência referência representativa dos restantes subtipos e CRFs relevantes na pandemia VIH/SIDA. A análise revelou existir a ocorrência de um evento de recombinação, em que o primeiro segmento, com aproximadamente 440pb, foi classificado como CRF02_AG (IBNG) e o segundo segmento, com aproximadamente 240 pb, classificado como CRF14_BG (9196/10) (Fig.16).

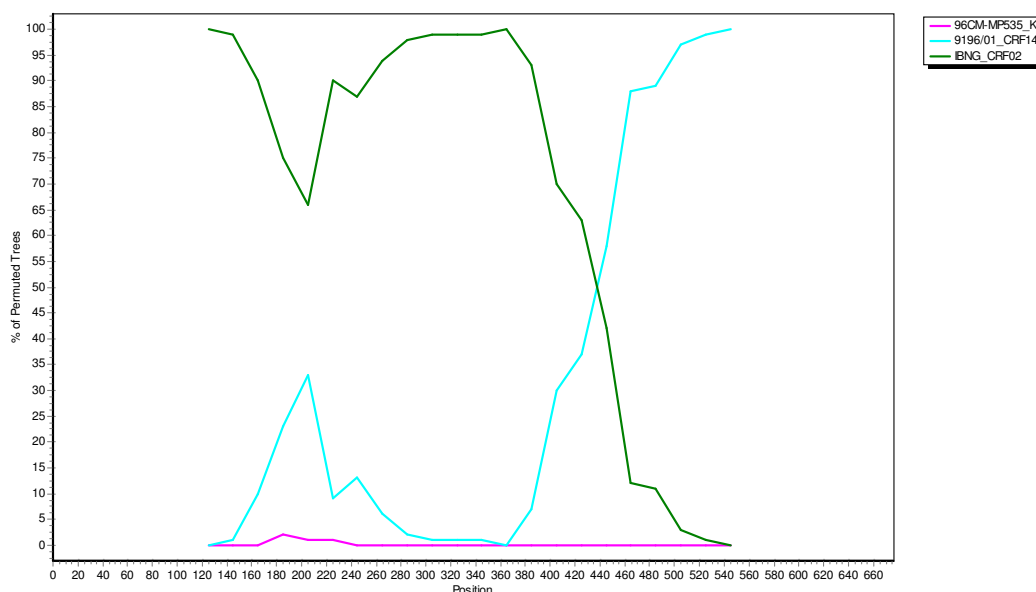


Fig.16: Análise por *bootscanning* para identificação de eventos de recombinação intragénica em *gag* de TX15. Os subtipos e/ou CRFs referência na análise estão indicados na legenda do gráfico.

b) Região *env*: Para proceder à análise filogenética com base no gene *env* foram comparados fragmentos com 545 pb de 21 sequências TX com 62 sequências referência. As diferentes formas genéticas do VIH-1, representadas pelas sequências referências, formaram agrupamentos distintos, suportados por valores de *bootstrap* elevados (Fig.17).

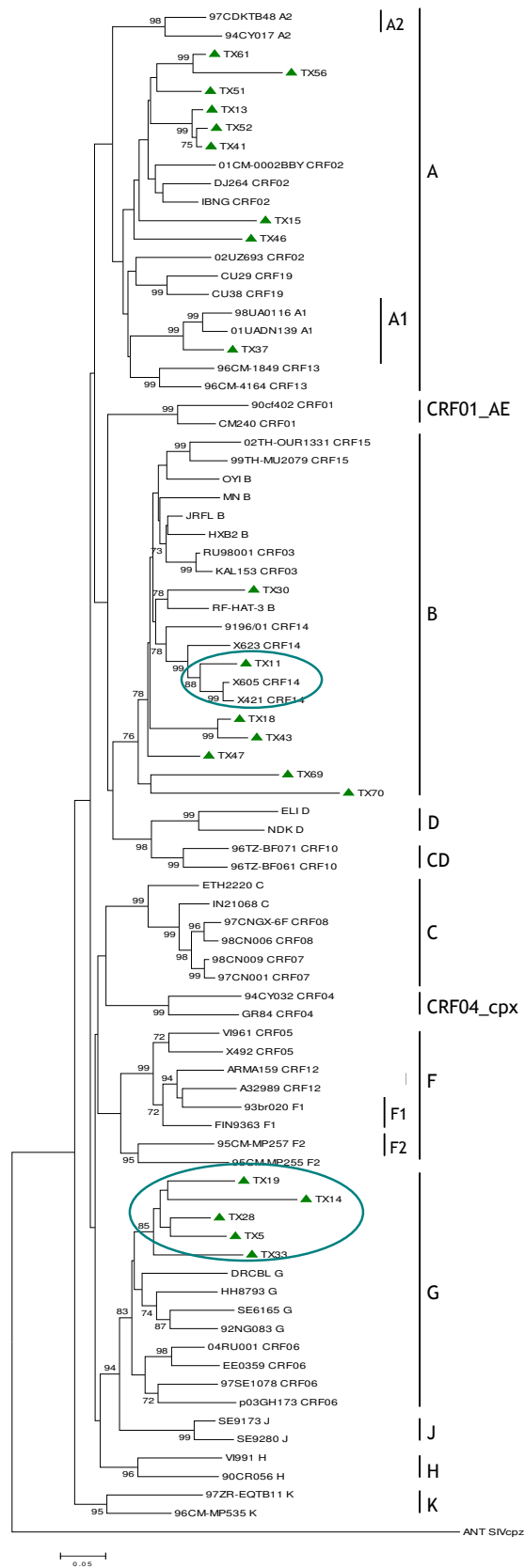


Fig.17: Análise filogenética do grupo de Infecções por VIH-1 Recentes com base no gene *env*. A análise por *bootstrap* foi feita com 1000 réplicas e os valores acima de 70% encontram-se representados na árvore. Os agrupamentos das sequências TX a salientar encontram-se delineados por círculos.

Numa análise geral, verificou-se que 9 (43%) sequências TX foram classificadas como subtipo A, 7 (33%) como subtipo B e 5 (24%) como subtipo G (Fig.18).

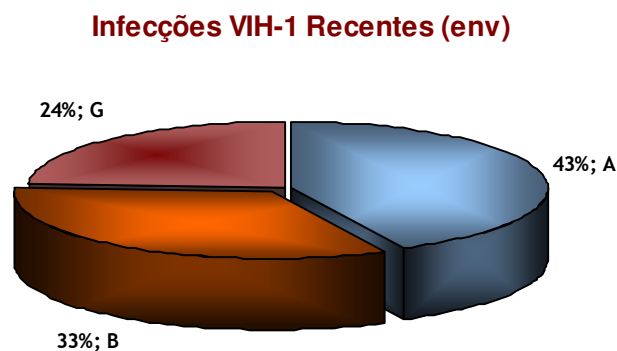


Fig.18: Distribuição das sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Recentes, consoante a sua classificação com base na região *env*

As sequências TX13, TX15, TX37, TX41, TX46, TX51, TX52, TX56 e TX61 agruparam no *cluster* definido para o subtipo A. A sequência TX37 foi claramente classificada filogeneticamente como pertencente ao sub-subtipo A1 (valor de *bootstrap* de 99%). As restantes sequências TX agruparam de uma forma mais isolada das restantes sequências referência, verificando-se agrupamentos suportados por elevados valores de *bootstrap* entre TX13, TX41 e TX52 (99%) e entre TX56 e TX61 (99%). Uma análise preliminar de algumas destas sequências (TX15 e TX46) através da ferramenta *Viral Genotyping Tool* demonstrou tratarem-se de sequências que se assemelham mais com a CRF02_AG ao longo da sequência nucleotídica correspondente ao gene *env*.

O grupo definido para o subtipo B foi robusto, apoiado por um valor de *bootstrap* de 76%. Dentro deste grupo pôde-se observar as sequências TX11, TX18, TX30, TX43, TX47, TX69 e TX70. A sequência TX11 agrupou com as sequências referência para a CRF14_BG, apoiada por um valor de *bootstrap* de 88%. Verificou-

se um isolamento das sequências TX18 e TX43, cujo agrupamento apresentou um valor de *bootstrap* de 99%. A sequência TX30 agrupou com significância estatística (78%) com a sequência referência para o subtipo B puro RF-HAT. As restantes três sequências TX encontraram-se dispersas dentro deste grupo filogenético.

O agrupamento definido para o subtipo G foi bastante robusto (valor de *bootstrap* de 83%), onde se observou a inclusão das sequências TX5, TX14, TX19, TX28 e TX33. Contudo, estas formaram um *cluster* isolado das sequências referência e muito robusto (valor de *bootstrap* de 85%).

c) Regiões *gag* e *env*: As classificações obtidas para as sequências TX foram comparadas para cada caso estudado. Por inferência filogenética e por *bootscanning* foi possível classificar 20 sequências TX pertencentes ao grupo das Infecções VIH-1 Recentes.

No conjunto, observou-se que para as 20 sequências TX houve concordância das classificações para 11 (55%) dos casos, todas classificadas como subtipos puros: 4 pertenciam ao subtipo A, 4 ao subtipo G e 3 ao subtipo B. As restantes 9 sequências TX foram consideradas recombinantes. Entre estas, TX11, TX30, TX47 e TX70 foram classificadas como G em *gag* e B em *env*, agrupando a sequência TX11, nas duas árvores filogenéticas, com sequências referência para a CRF14_BG. As restantes sequências TX30, TX47 e TX70, embora em *gag* tivessem sido incluídas no agrupamento para a CRF14_BG, para *env* a sua distribuição foi dispersa dentro do subtipo B; as sequências TX56 e TX61 foram classificadas como G em *gag*, agrupando com sequências para a CRF14_BG, e como A para *env*; TX37 foi filogeneticamente classificada como recombinante A1B, agrupando em *env* juntamente com sequências do sub-subtipo A1 e em *gag* no grupo definido para o

subtipo B; as restantes duas sequências TX (TX15 e TX51) foram classificadas como recombinantes intragénicos em *gag*: para TX15 a recombinação ocorreu entre a CRF02_AG e a CRF14_BG, enquanto para TX51 a recombinação ocorreu entre o subtipo B e o J. Ambos casos foram classificados como subtipo A para *env* (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação por inferência filogenética e *bootscanning* das sequências TX do grupo das Infecções VIH Recentes com base nas regiões genómicas *gag* e *env* do VIH-1.

Caso	Análise das Sequências		
	Subtipo <i>gag</i>	Subtipo <i>env</i>	Subtipo <i>gag+env</i>
TX5	G	G	G
TX11	G	B	BG
TX13	A	A	A
TX14	G	G	G
TX15	CRF02_AG/CRF14_BG	A	CRF02/CRF14/A
TX18	B	B	B
TX19	(-)	G	(-)
TX28	G	G	G
TX30	G	B	BG
TX33	G	G	G
TX37	B	A1	AB
TX41	A1	A	A
TX43	B	B	B
TX46	A	A	A
TX47	G	B	BG
TX51	BJ	A	ABJ
TX52	A	A	A
TX56	G	A	AG
TX61	G	A	AG
TX69	B	B	B
TX70	G	B	BG

(-) significa que não foi possível obter uma classificação para a sequência em causa.

4.3 Relações Moleculares entre Infecções Antigas e Recentes

Para estudar as possíveis relações epidemiológicas entre as sequências TX pertencentes aos dois grupos estudados procedeu-se à construção de duas árvores filogenéticas, cada uma corresponde a uma região genómica (*env*, *gag*), e posterior análise conjunta dos dados.

a) Região *gag*: Na construção da árvore para *gag* foram comparados fragmentos com 709 pb de 45 sequências TX com 62 sequências referência (Fig.19).

Os agrupamentos para os subtipos e principais CRFs representadas na árvore pelas sequências referência mantiveram-se iguais aos apresentados nas análises efectuadas para cada grupo em separado. Contudo, os valores de *bootstrap* foram menores e, consequentemente, alguns grupos não apresentaram a robustez esperada.

Nesta análise, as classificações para as sequências TX concordaram com as anteriormente obtidas. Como era esperado, apenas nos agrupamentos B e G se observou a inclusão das sequências TX Antigas e Recentes, não havendo segregação destas em *clusters* distintos e separados dentro dos agrupamentos correspondentes a cada subtipo viral.

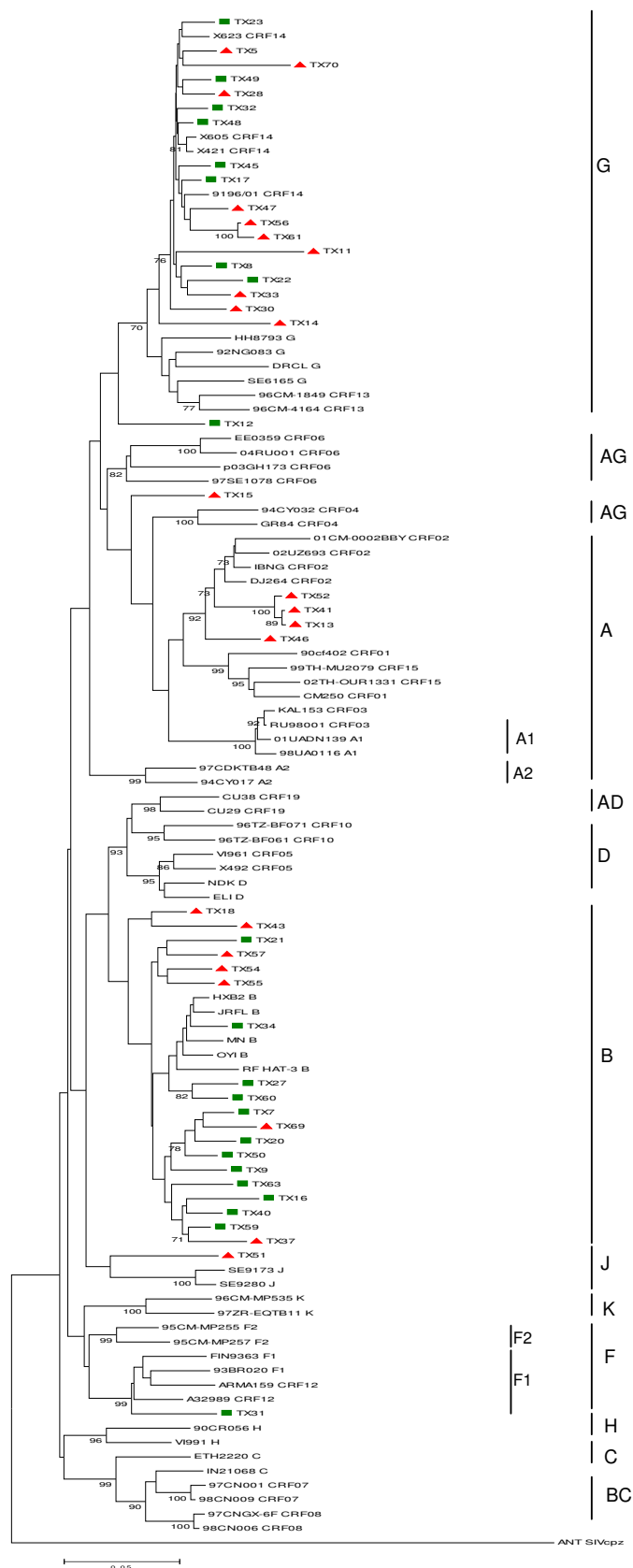


Fig.19: Análise filogenética das 46 sequências TXag pertencentes ao grupo de Infecções VIH-1 Recentes (■) e do grupo de Infecções VIH-1 Recentes (▲). A análise por *bootstrap* foi feita com 1000 réplicas e os valores acima de 70% encontram-se representados na árvore.

b) Região env: Na construção da árvore filogenética foram comparados fragmentos do gene *env* com 528 pb de 46 sequências TX com 62 sequências referência (Fig.20).

As classificações obtidas para as sequências TX nesta nova árvore filogenética foram concordantes com as obtidas nas árvores filogenéticas construídas para cada grupo individualmente. No grupo definido para o subtipo B verificou-se que nove sequências TX (7 TX Antigas + 2 TX Recentes) (TX7, TX9, TX20, TX50, TX54, TX57, TX59, TX69 e TX70) formaram um agrupamento misto e isolado das restantes sequências, suportado por um valor de *bootstrap* de 77%. Dentro do grupo definido para o subtipo G verificou-se que todas sequências TX (n=10; 5 TX Antigas + 5 TX Recentes) formaram um *cluster* isolado de todas as sequências referência do subtipo G e bastante coeso com um valor de *bootstrap* de 92%.

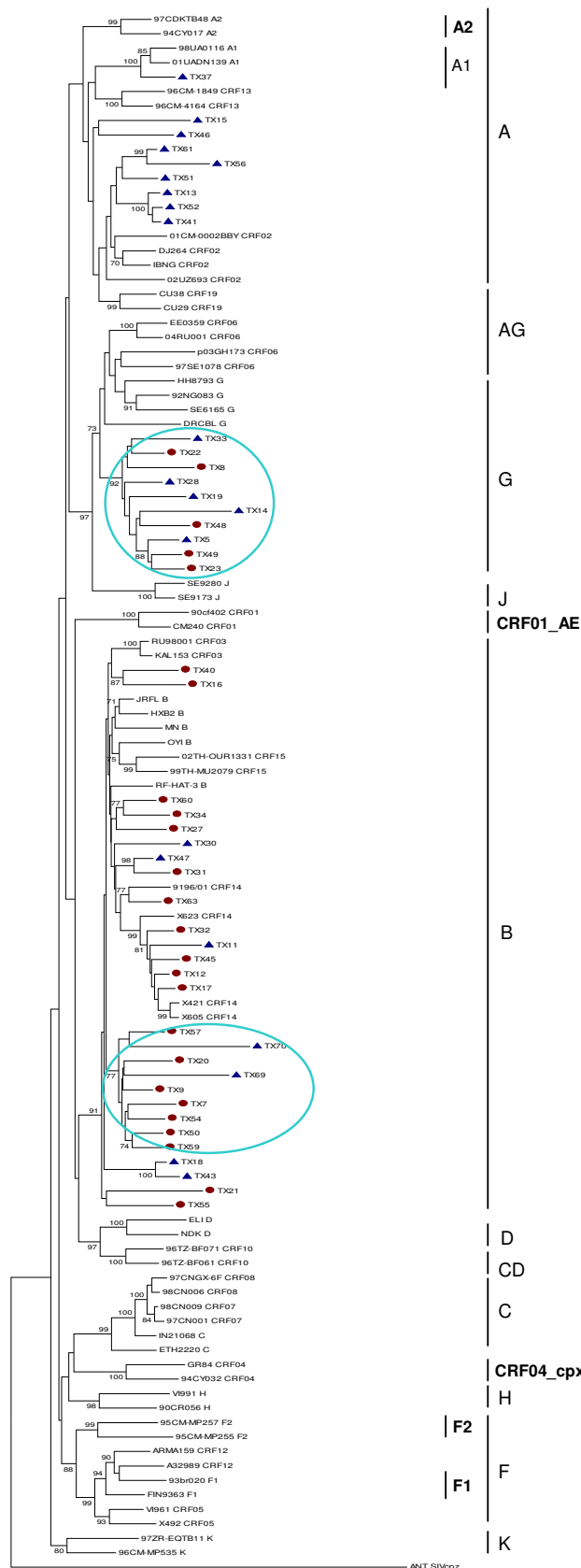


Fig.20: Análise filogenética das 46 seqüências TXenv obtidas a partir do grupo das Infecções VIH-1 Antigas (●) e do grupo das Infecções VIH-1 Recentes (▲). A análise por *bootstrap* foi feita com 1000 réplicas e os valores acima de 70% encontram-se representados na árvore.

Estudos publicados com base em sequências classificadas para a região codificante da gp120 e obtidas de indivíduos residentes em Portugal (a partir de imigrantes africanos e toxicodependentes) apresentaram a proposta da existência de um potencial sub-subtipo português a que os autores denominaram de G^P ^{78, 73}. No presente estudo, devido a observarmos dentro do subtipo G um agrupamento bem definido (valor de *bootstrap* de 92%) contendo sequências TX e isolado das restantes sequências referência, optou-se por averiguar qual seria a relação entre as diferentes sequências. Para a construção da árvore filogenética foram comparados fragmentos do gene *env* com 346 pb obtidas a partir das 46 sequências TX, de seis sequências G^P publicadas e das 62 sequências referência anteriormente utilizadas (Fig.21). As sequências TX mantiveram um agrupamento isolado das restantes sequências referência, mas agora juntas com as sequências G^P. Apesar dos resultados indicarem que as sequências TX e as sequências G^P são sequências diferentes das sequências referência para o subtipo G, os baixos valores de *bootstrap* encontrados não permitiram reforçar a proposta de existência de um putativo sub-subtipo G^P que englobe sequências de isolados obtidos em Portugal.



Ana Filipa Silva

4.4 Comparação do Padrão Molecular da Infecção nos Grupos

Analisando as formas genéticas do VIH-1 detectadas nos dois grupos estudados observou-se que existiu uma alteração do padrão molecular da infecção por VIH-1 de 1998 para 2004. Verificou-se uma diminuição acentuada da prevalência do subtipo B do grupo Infecções VIH-1 Antigas (60%) para o grupo Infecções VIH-1 Recentes (15%). Comparando o número e as formas não B do VIH-1 entre os dois grupos verificou-se que estas estão em maior número e associadas com o grupo Infecções VIH-1 Recentes (Fisher Exact Test; $p=0.003$). Os dados obtidos sugerem que o período de tempo que separa os dois grupos, terá ocorrido a introdução do subtipo A na população, tanto numa forma pura como na forma mais próxima da CRF02_AG, e que também outras novas formas recombinantes (AG, AB, ABJ e CRF02_AG/CRF14_BG/A) parecem ter surgido em comparação às já identificadas no grupo Infecções VIH-1 Antigas (BG e BF). Estes resultados sugerem que existe em Portugal um padrão molecular de infecção VIH-1 diversificado e claramente distinto de outros países europeus.

Discussão e Conclusão

1. Discussão

O VIH-1 é um vírus extremamente mutável que altera facilmente a sua composição genómica e origina uma grande diversidade de variantes genéticas. Esta diversidade atinge o seu maior expoente no grupo M, dividindo-se em diversas classes com base na percentagem de semelhança entre os genomas virais. Reconhecendo que a lista de CRFs, assim como o aparecimento de formas geneticamente recombinadas, está continuamente em crescimento, é plausível colocar-se a hipótese de que os actuais nove subtipos identificados tenham sido, em parte, fruto de recombinações com sucesso entre subtipos ancestrais que terão desaparecido ao longo da evolução^{37, 91}.

A presença simultânea de múltiplas formas virais em circulação numa dada população/região favorece os eventos de recombinação genética. Este acontecimento é observado frequentemente na região Central de África, apontada como sendo o berço dos subtipos e da maioria das CRFs identificados. Fora desta região, esta situação também pode ser observada em populações de toxicodependentes com comportamentos de risco. A partilha de material contaminado no consumo de drogas por via intravenosa leva a um constante risco de exposição ao vírus e consequentemente a infecções múltiplas com elevada probabilidade de ocorrer recombinações entre diferentes genomas do VIH-1. Outro factor que reforça o importante papel da população toxicodependente na pandemia VIH/SIDA é ser reconhecida como uma forma rápida e dinâmica de disseminação da infecção e das novas variantes virais para a comunidade em geral. Assim, a população toxicodependente é um grupo de eleição para os estudos de caracterização do padrão da infecção por VIH-1 e para conhecimento da evolução molecular ao longo do tempo.

O presente estudo foi proposto com o intuito de determinar e avaliar a possível evolução da diversidade genética do VIH-1 ao longo do tempo, com base na classificação dos vírus atendendo à análise dos genes *env* e *gag*, numa população de toxicodependentes residentes na área de Lisboa, sabendo à partida que essas infecções ou foram adquiridas recentemente ou estavam já estabelecidas há um relativo longo período de tempo nos indivíduos infectados.

1.1 Grupo Infecções VIH-1 Antigas

No grupo Infecções VIH-1 Antigas observou-se uma prevalência do subtipo B em 60% dos casos. Este facto está de acordo com o padrão molecular descrito para a Europa Ocidental^{22, 49, 58}. Contudo, na década de 90, a percentagem de outras formas genéticas não B era já bastante elevada, destacando Portugal na Europa Ocidental. A elevada diversidade observada no grupo poderá ser um reflexo das relações estabelecidas e mantidas com as ex-colónias portuguesas e pela introdução das variantes não B do VIH-1 na comunidade em geral.

Focando a discussão apenas nos casos classificados como formas genéticas não B, 50% (TX8, TX22, TX23, TX48 e TX49) foram classificados como subtipo G. Este é um subtipo bastante disseminado na Península Ibérica e com uma origem africana^{91, 92, 82}. Embora estas sequências tenham sido classificadas como G para ambas regiões, o facto de em *gag* terem agrupado com as sequências referência para a CRF14_BG levanta a hipótese de se tratar de recombinantes de segunda geração entre o subtipo G e a CRF14_BG, com origem e franca disseminação na Península Ibérica. Estas sequências (TX8, TX22, TX23, TX48 e TX49) agruparam em *env* com as referências para o potencial sub-subtipo português G^P, embora esta relação não tenha sido apoiada por valores de bootstrap significativos (talvez explicado pelo

número relativamente baixo de nucleotídeos analisados). Para verificar se estas sequências pertencerão a este putativo sub-subtipo, seria interessante analisar o do restante genoma viral e verificar se as sequências TX mantêm a relação filogenética com G^P e qual a proximidade destas com referências para a CRF14_BG. Nenhum dos indivíduos infectados em causa referiu qualquer contacto directo com o continente Africano, tendo por isso as infecções por VIH-1 uma origem provável em Portugal.

As sequências TX12, TX17, TX31, TX32 e TX45 são os recombinantes detectados no grupo Infecções VIH-1 Antigas e podem reflectir a elevada prevalência do subtipo B na altura e a sua participação nos eventos de recombinação (BF, BG e CRF14_BG/B). Tendo em conta a maior probabilidade de ocorrência de recombinação entre diferentes variantes genéticas do VIH-1 no tipo de população estudada (comportamentos de risco e diversidade de subtipos presentes), estes recombinantes poderão ter surgido na própria população e não terem sido introduzidos a partir de contactos com outras regiões ou populações de infectados. O facto dos três recombinantes BG (TX17, TX32 e TX45) terem agrupado com sequências referência para a CRF14 para ambas regiões aponta para a sua classificação como CRF14_BG. A apoiar estes factos estão as informações epidemiológicas dos indivíduos aos quais estas sequências correspondem, que nasceram em Portugal e ou não saíram do país (TX45) ou apenas se deslocaram para Espanha (TX17 e TX32).

Os resultados obtidos, referentes ao grupo de toxicodependentes cujas infecções por VIH-1 decorreram entre 1994 e 1998, mostram que a diversidade do VIH-1 está presente em Portugal desde o início da década de 90 e que esta há

muito está presente na população portuguesa, devendo-se principalmente a formas recombinantes do tipo da CRF14_BG.

1.2 Grupo Infecções VIH-1 Recentes

No grupo Infecções VIH-1 Recentes observou-se que o subtipo B perdeu a sua predominância, passando de 60% (grupo Infecções VIH-1 Antigas) para apenas 15% das infecções e que o número de formas geneticamente recombinadas (n=9) foi equivalente ao número de subtipos puros (n=11) encontrados neste grupo.

Foi possível observar que o subtipo A terá sido introduzido mais recentemente nesta população toxicodependente, não tendo sido encontrados casos deste subtipo no grupo Infecções VIH-1 Antigas. Os casos classificados como subtipo A (TX13, TX41, TX46 e TX52) mostraram uma relação filogenética próxima com as sequências referência para a CRF02_AG, particularmente em *gag*. Embora para *env* a sua disposição na árvore possa levantar algumas dúvidas, a análise por BLAST também indicou para ambas regiões uma grande semelhança com a CRF02_AG. Esta CRF teve origem na zona Ocidental de África e tem sido frequentemente descrita em imigrantes africanos residentes na Europa. Epidemiologicamente podemos constatar que todos estes indivíduos referem deslocações para países europeus onde esta CRF foi já descrita e T13 é imigrante de Moçambique^{93, 94, 71}. Casos semelhantes foram apresentados em estudos realizados em Portugal^{85, 78, 73}, publicados entre 2003 e 2005, em que todas as sequências subtipadas como A eram filogeneticamente mais semelhantes com a CRF02_AG.

O subtipo A foi igualmente observado em dois casos de recombinação com o subtipo G (TX56 e TX61) e num caso com o subtipo B (TX37). Para TX56 e TX61, as sequências *env* foram classificadas como A, agrupando com as sequências

referência para a CRF02_AG enquanto as sequências *gag* foram classificadas como subtipo G, agrupando com as sequências referência para a CRF14_BG. Estes resultados indicam poder tratar-se de uma variante que surgiu a partir de eventos de recombinação entre as duas CRFs. A classificação para estes dois casos é coincidente para ambas as regiões com os resultados obtidos pela análise BLAST. A sequência TX37 foi classificada em *gag* como subtipo B e em *env* como sub-subtipo A1. Este tipo de recombinante (BA1), sem semelhanças genómicas com qualquer CRF descrita pode estar relacionado com o facto de o indivíduo ser natural de Marrocos e referir estadias também em Espanha, aumentando a probabilidade de ocorrência de infecções múltiplas e recombinação com formas genéticas do VIH-1 (sub-subtipo A1) não frequentemente descritas em Portugal.

Os resultados obtidos para o subtipo A sugerem uma crescente importância no panorama de infecção VIH/SIDA em Portugal e que a sua entrada e disseminação, provavelmente na forma da CRF02_AG, foi rápida e eficaz, equiparando-se actualmente em proporção aos subtipos G e B, que já possuem uma presença mais antiga nas infecções por VIH-1 em Portugal.

As sequências classificadas como subtipo G (TX5, TX14, TX28 e TX33), agruparam em *gag* com as sequências referência para a CRF14_BG e em *env* formaram um *cluster* robusto e isolado das sequências referência. Numa segunda análise filogenética para *env*, incluindo sequências publicadas para o potencial sub-subtipo G^P, revelou que estas sequências TX agruparam juntamente com as sequências G^P e com as sequências TX do grupo Infecções VIH-1 Antigas, isoladas das sequências referência para o subtipo G. Estas sequências TX ou pertencerão ao potencial sub-subtipo português para G ou eventualmente podem ter resultado de

um recombinante de segunda geração, que se encontra também em ampla circulação na população toxicodependente em que o estudo incidiu.

As sequências TX11, TX30, TX47 e TX70 foram classificadas como recombinantes BG. O agrupamento robusto de TX11 com sequências referência para a CRF14_BG, em ambas regiões, é um forte indicador de que esta sequência poderá ser uma CRF14_BG. As restantes três sequências TX agruparam em *env* com sequências referência para o subtipo B, colocando-se a hipótese de terem surgido através de eventos de recombinação entre a CRF14_BG e o subtipo em causa.

1.3 Evolução do Padrão Molecular da Infecção VIH-1

A análise filogenética efectuada após a junção dos dois grupos estudados mostrou que não houve segregação das sequências consoante o grupo a que pertenciam (Infecções VIH-1 Antigas vs Infecções VIH-1 Recentes). O facto das sequências classificadas como B, G e A, não formarem *clusters* monofiléticos sugere que estes subtipos foram inseridos nesta população toxicodependente através de múltiplas introduções ao longo do tempo.

A comparação entre as classificações obtidas nos dois grupos permite concluir que houve uma evolução no padrão molecular da infecção VIH nesta população, em que o grupo Infecções VIH-1 Recentes apresenta uma maior diversidade de variantes genéticas não B, em relação às classificadas como subtipo B, que o grupo Infecções VIH-1 Antigas ($p=0.003$).

Do grupo Infecções VIH-1 Antigas para o grupo Infecções VIH-1 Recentes verificou-se um decréscimo da importância do subtipo B na sua forma pura (de 60% para 15%), actualmente equivalente à proporção para os subtipos G e A.

Enquanto que todos os recombinantes detectados no grupo Infecções VIH-1 Antigas incluíam a participação do subtipo B, este apenas está presente em 67% dos casos de recombinantes identificados no grupo Infecções VIH-1 Recentes.

O subtipo A terá sido introduzido mais recentemente nesta população, provavelmente no intervalo de tempo que separa os dois grupos, sendo detectado tanto na forma pura como na recombinada no grupo Infecções VIH-1 Recentes.

Relativamente ao subtipo G a sua prevalência na forma pura manteve-se igual nos dois grupos (20% dos casos) mas aumentou a sua participação nas formas recombinantes (de 16% para 35%) no grupo Infecções VIH-1 Recentes. Estas formas englobam os recombinantes BG, presentes em ambos os grupos com frequência semelhantes, e os novos recombinantes AG, detectados apenas no grupo Infecções VIH-1 Recentes.

2. Conclusão e Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma evolução no padrão molecular da infecção do VIH-1, através da crescente diversidade e introdução de novos subtipos e de novas formas recombinantes no grupo Infecções VIH-1 Recentes. Actualmente, é possível identificar na população estudada, além das variantes não B do VIH-1 já descritas na população portuguesa e observadas no grupo Infecções VIH-1 Antigas (subtipo G e potencialmente a CRF14_BG) e outras formas genéticas, possivelmente na forma de CRF02_AG. Esta CRF é reconhecida como sendo uma das principais responsáveis pela pandemia VIH/SIDA. Outras formas virais descritas como geograficamente mais localizadas, como por exemplo o recombinante BF (América do Sul) foram também identificadas neste estudo.

De futuro seria interessante aprofundar o conhecimento molecular e biológico dos casos de infecção VIH-1, através da análise do restante genoma viral, nomeadamente das variantes identificadas como potenciais CRFs que ainda não foram descritas (como os casos TX15 e TX51). Estudos *in vitro* que permitissem caracterizar biologicamente estas variantes poderiam também contribuir para a identificação de quais as formas moleculares potencialmente associadas a uma maior virulência, transmissibilidade e susceptibilidade ou resistências aos fármacos.

Referências Bibliográficas

1. Antunes F: *Manual Sobre a SIDA*. Permanyer, 2004.
2. AVERT: http://www.avert.org/his81_86.htm. 2007.
3. Barré-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.
4. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, et al.: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;233:343-346.
5. Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S and Sridharan G: Molecular epidemiology of HIV. *Indian Journal of Medical Research* 2005;121:333-344.
6. Lal R, Chakrabarti S and Yang C: Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res* 2005;121:287-314.
7. Padua E, Jenkins A, Brown S, et al.: Natural variation of the nef gene in human immunodeficiency virus type 2 infections in Portugal. *J Gen Virol* 2003;84:1287-1299.
8. Gomes P, Abecasis A, Almeida M, Camacho R and Mansinho K: Transmission of HIV-2. *Lancet Infect Dis* 2003;3:683-684.
9. Levy J: Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993;57:183-289.
10. Fauci A, Pantaleo G, Stanley S and Weissman D: Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;124:654-663.
11. Lederman M, Rodriguez B and Sieg S: Immunopathogenesis of HIV Infection. 2006.
12. Rubbert A, Behrens G and Ostrowski M: *HIV Medicine*. Flying Publisher, 2007.
13. Cummins J and Dezzutti C: Sexual HIV-1 Transmission and Mucosal Defense Mechanisms. *AIDS Rev* 2000;2:144.
14. Musoke Philippa M and Miro F: Prevention of HIV Mother to Child Transmission: A Review. *AIDS rev* 2000;2:263-274.
15. UNAIDS: 2007 AIDS Epidemic Update. 2007.
16. UNAIDS: 2006 Report on the Global AIDS Epidemic. 2006.
17. INSA: situação da sida em portugal a 30 de junho de 2007. 2007.
18. Holmes E: On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol Rev Camb Philos Soc* 2001;76:239-254.
19. Hahn B, Shaw G, De Cock K and Sharp P: AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000;287:607-614.
20. Gao F: Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999;397:436-441.
21. Marx P, Apetrei C and Drucker E: AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol* 2004;33:220-226.
22. Anastassopoulou CG and Kostrikis LG: Global genetic variation of HIV-1 infection. *Current Hiv Research* 2006;4:365-373.
23. Freed E: HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001;26:13-33.

24. Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE: *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
25. Wu Y: HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 2004;1:13.
26. Weiss R: Getting to know HIV. *Trop Med Int Health* 2000;5:A10-15.
27. Piguet V and Blauvelt A: Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* 2002;119:365-369.
28. Zhu T: HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:309-311.
29. Dragic T: An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol* 2001;82:1807-1814.
30. Nielsen M, Pedersen F and Kjems J: Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* 2005;2:10.
31. Doms R and Trono D: The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* 2000;14:2677-2688.
32. Bukrinsky M: A hard way to the nucleus. *Mol Med* 2004;10:1-5.
33. Nisole S and Saïb A: Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 2004;1:9.
34. Simon V, Ho D and Abdool Karim Q: HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 2006;368:489-504.
35. Galetto R and Negroni M: Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev* 2005;7:92-102.
36. McCutchan FE: Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology* 2006;78:S7-S12.
37. Salminen M: HIV Inter-subtype Recombination -Consequences for the Epidemic. *AIDS Reviews* 2000;2:178-189.
38. Yuste E, López-Galíndez C and Domingo E: Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000;74:9546-9552.
39. Thomson M, Pérez-Alvarez L and Nájera R: Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002;2:461-471.
40. Gürtler L, Hauser P, Eberle J, et al.: A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994;68:1581-1585.
41. Simon F, Maucière P, Roques P, et al.: Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998;4:1032-1037.
42. McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK and Burke DS: HIV-1 genetic diversity. *Aids* 1996;10:S13-S20.
43. Spira S, Wainberg M, Loemba H, Turner D and Brenner B: Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;51:229-240.

44. Wainberg M: HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 2004;18:S63-S68.
45. Perrin L, Kaiser L and Yerly S: Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 2003;3:22-27.
46. Meloni S, Sankalé J, Hamel D, et al.: Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A3 in Senegal from 1988 to 2001. *J Virol* 2004;78:12455-12461.
47. Meloni S, Kim B, Sankalé J, et al.: Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol* 2004;78:12438-12445.
48. Vidal N, Mulanga C, Edidi Bazepeo S, Lepira F, Delaporte E and Peeters M: Identification and Molecular Characterization of Subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2006;22:182-187.
49. Thomson M and Nájera R: Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev* 2005;7:210-224.
50. Gao F, Robertson D, Morrison S, et al.: The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996;70:7013-7029.
51. Alamos L: HIV Databases [<http://www.hiv.lanl.gov/>]. 2007.
52. Thomson MM: Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into western countries. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:1732-1737.
53. Stebbing J, Powles, T., Nelson, M., Bower, M.: Significance of Variation Within HIV, EBV, and KSHV Subtypes. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 2006;5:93-102.
54. Casado G: Identification of a novel HIV-1 circulating AIDG intersubtype recombinant form (CRF1_9_cpx) in Cuba. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2005;40:532-537.
55. Quiñones-Mateu M and Arts E: Recombination in HIV-1: Update and Implications. *AIDS Reviews* 1999;1:89-100.
56. Osmanov S: Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2002;29:184-190.
57. von Truchsess I: The first B/G intersubtype recombinant form of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) identified in Germany was undetected or underquantitated by some commercial viral load assays. *Journal of Medical Virology* 2006;78:311-317.
58. Thomson M and Nájera R: Increasing HIV-1 Genetic Diversity in Europe. *The Journal of Infectious Diseases* 2007;196:1120-1124.
59. Lin Y, Lan Y, Chen Y, et al.: Molecular epidemiology of HIV-1 infection and full-length genomic analysis of circulating recombinant form 07_BC strains from injection drug users in Taiwan. *J Infect Dis* 2007;195:1283-1293.
60. Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K and Takebe Y: Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants

- comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. *J Virol* 2003;77:685-695.
61. WHO: HIV/AIDS in Europe: Moving from death sentence to chronic disease management. (Srdan Matic JVL, ed.), 2006.
 62. Bobkov A, Kazennova E, Selimova L, et al.: A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:669-676.
 63. Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Selimova L, et al.: An HIV type 1 epidemic among injecting drug users in the former Soviet Union caused by a homogeneous subtype A strain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:1195-1201.
 64. Liitsola K, Tashkinova I, Laukkanen T, et al.: HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 1998;12:1907-1919.
 65. Novitsky V, Montano M and Essex M: Molecular epidemiology of an HIV-1 subtype A subcluster among injection drug users in the Southern Ukraine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:1079-1085.
 66. Johnson B and Buzducea D: HIV-positive Romanian Adolescents: Acquisition Routes, Risk Behaviors, and Psychological Correlates. *AIDS and behaviour* 2007;11:716-725.
 67. Semaille C, Alix J, Downs A and Hamers F: The HIV infection in Europe: large East-West disparity. *Euro Surveill* 2003;8:57-64.
 68. Rosinska M: Current trends in HIV/ AIDS epidemiology in Poland, 1999 - 2004. *Euro Surveill* 2006;11.
 69. Hamers F, Batter V, Downs A, Alix J, Cazein F and Brunet J: The HIV epidemic associated with injecting drug use in Europe: geographic and time trends. *AIDS* 1997;11:1365-1374.
 70. Yerly S, Jost S, Monnat M, et al.: HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. *AIDS* 2004;18:1413-1421.
 71. Mezei M, Balog K, Babic D, et al.: Genetic variability of gag and env regions of HIV type 1 strains circulating in Slovenia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:109-113.
 72. Thomson M and Najera R: Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *J Infect Dis* 2007;196:1120-1124.
 73. Esteves A, Parreira R, Piedade J, et al.: Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:511-517.
 74. Thomson M, Delgado E, Manjón N, et al.: HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS* 2001;15:509-516.
 75. Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello M and Buonaguro F: Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example. *Retrovirology* 2007;4:34.

76. Snoeck J, Van Laethem K, Hermans P, et al.: Rising prevalence of HIV-1 non-B subtypes in Belgium: 1983-2001. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:279-285.
77. Couturier E, Damond F, Roques P, et al.: HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network. *AIDS* 2000;14:289-296.
78. Esteves A, Parreira R, Venenno T, et al.: Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:313-325.
79. Fleury H, Recordon-Pinson P, Caumont A, et al.: HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:41-47.
80. Deroo S, Robert I, Fontaine E, et al.: HIV-1 subtypes in Luxembourg, 1983-2000. *AIDS* 2002;16:2461-2467.
81. Tagliamonte M, Vidal N, Tornesello M, Peeters M, Buonaguro F and Buonaguro L: Genetic and phylogenetic characterization of structural genes from non-B HIV-1 subtypes in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:1045-1051.
82. Delgado E, Thomson M, Villahermosa M, et al.: Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:536-543.
83. Palma A, Araújo F, Duque V, Borges F, Paixão M and Camacho R: Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect Genet Evol* 2007;7:391-398.
84. UNAIDS: 2004 Update: Epidemiological Fact Sheets on HIV/AIDS and sexually transmitted infections - Portugal. 2004.
85. Parreira R, Pádua E, Piedade J, Venenno T, Paixão M and Esteves A: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *J Med Virol* 2005;77:8-16.
86. Delwart E, Shpaer E, Louwagie J, et al.: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-1261.
87. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, et al.: Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol* 2000;74:363-370.
88. Thompson J, Higgins D And Gibson T: Clustal-W - Improving The Sensitivity Of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties And Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids ResearCH* 1994;22:4673-4680.
89. Saitou N and Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
90. Lole K, Bollinger R, Paranjape R, et al.: Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;73:152-160.

91. Abecasis A, Lemey P, Vidal N, et al.: Recombination confounds the early evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1: subtype G is a circulating recombinant form. *J Virol* 2007;81:8543-8551.
92. Abecasis A, Paraskevis D, Epalanga M, et al.: HIV-1 genetic variants circulation in the North of Angola. *Infect Genet Evol* 2005;5:231-237.
93. Lawrence P, Lutz M, Saoudin H, et al.: Analysis of polymorphism in the protease and reverse transcriptase genes of HIV type 1 CRF02-AG subtypes from drug-naïve patients from Saint-Etienne, France. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:396-404.
94. Vachot L, Ataman-Onal Y, Terrat C, et al.: Short communication: retrospective study to time the introduction of HIV type 1 non-B subtypes in Lyon, France, using env genes obtained from primary infection samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:687-691.
95. Holguín ARdA, E. Rivas, P. Soriano, V.: Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev* 2006;8:98-107.
96. Rivas P, Holguín A, Ramírez de Arellano E, et al.: [Antiviral therapy according to HIV type and subtype.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24 Suppl 2:29-33.

Mestrado em Microbiologia Clínica (3ª edição)

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Anexos

Anexo 1: Formulário de Consentimento Informado

Anexo 2: Folha de Recolha de Dados

Anexo 3: Informações Epidemiológicas dos Casos Estudados

Anexo 1

Formulário de Consentimento Informado

Consentimento Informado

Para os devidos efeitos, declaro que eu (Nome),
_____, me encontro
devidamente esclarecido(a) sobre o projecto em que irei participar e
autorizo que o meu sangue seja submetido a estudos de investigação na
área de caracterização molecular do VIH-1. O Laboratório de Referência
da SIDA garante a confidencialidade dos resultados.

Lisboa, ____/____/____

(assinatura)*

Obrigado pela sua participação.

*** Esta folha será arquivada no processo da consulta ao qual o laboratório não tem acesso**

Anexo 2

Folha de Recolha de Dados

Este inquérito destina-se ÚNICA E EXCLUSIVAMENTE à recolha de informação para fins de investigação laboratorial da infecção VIH-1 e a informação nele contida é CONFIDENCIAL

Data: ____/____/____

Naturalidade: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Género: Masculino ☐ Feminino ☐

Estadias fora de Portugal

Viajou ou residiu em países fora de Portugal? Não ☐ Sim ☐

Em que anos? _____

Para que países? _____

Quanto tempo? _____

Consumo de Drogas Injectáveis

Durante quanto tempo consumiu drogas injectáveis? _____

Que tipo de drogas consumiu? _____

Actualmente ainda consome drogas injectáveis? _____

Anexo 3

Informações Epidemiológicas dos Casos Estudados

Informações Epidemiológicas Recolhidas à Data de Colheita

Caso	Género	Idade (data colheita)	Ano de Infecção	Período de tempo de infecção (anos)	Naturalidade	Droga(s) Consumida(s)	Consumo de drogas injectáveis		Idas Estrangeiro
							Atualmente	Passado	
TX5	M	36	2004	2	Portugal	H	Não	1,5 anos	Não
TX11	M	39	2005	1	Portugal	H+C	Não	20 anos	Espanha, França, Alemanha
TX13	M	31	2005	1	Moçambique	H+C	Não	5 anos	Espanha
TX14	F	34	2004	2	Portugal	H+C	Não	1,5 anos	Alemanha
TX15	M	46	2005	1	Portugal	H+C	Sim	23 anos	Espanha, Itália, Holanda, Inglaterra, Marrocos
TX18	M	37	2006	<1	Portugal	H+C	Sim	NR	Não
TX19	F	38	2004	2	Portugal	C	Não	6 meses	Não
TX28	F	42	2004	2	Portugal	H+C	Não	2 anos	Não
TX30	M	34	2005	1	Portugal	H	Não	3 anos	Não
TX33	M	40	2004	2	Portugal	H+C	Não	20 anos	Espanha
TX37	M	23	2005	1	Marrocos	H+C	Não	1 ano e meio	Marrocos, Espanha
TX41	F	29	2004	2	Portugal	H+C	Não	10 anos	Não
TX43	M	43	2005	1	Cabo Verde	H+C	Não	1 ano	Espanha França e Inglaterra
TX46	F	27	2004	2	Portugal	H+C	Não	NR	França; Bélgica
TX47	M	41	2005	1	Portugal	H+C	Sim	12 anos	Não
TX51	F	48	2005	1	Portugal	H+C	Não	NR	Espanha, Italia, França, Bélgica Holanda
TX52	M	35	2005	1	Portugal	H+C	Sim	17 anos	Inglaterra; Eslovenia, Holanda e Espanha
TX56	M	51	2006	<1	Portugal	H+C	NR	30 anos	Não
TX61	M	34	2005	1	Portugal	H+C	Sim	13 anos	Não
TX69	M	41	2005	1	Portugal	H+C	Não	14 anos	Espanha
TX70	M	27	2005	1	Portugal	H+C	Sim	3 aos	Espanha, França, Bélgica, Holanda e Alemanha
TX7	M	44	1997	9	Portugal	H+C	Não	20 anos	Espanha
TX8	M	34	1998	8	Portugal	H+C	Não	10 anos	Espanha
TX9	M	40	1998	8	Portugal	H+C	Sim	20 anos	Não
TX12	M	38	1994	12	Portugal	H+C	Não	17 anos	Espanha
TX16	M	47	1996	10	Portugal	H	Não	21 anos	Espanha
TX17	F	47	1997	9	Portugal	H+C	Não	1 ano	Espanha
TX20	M	38	1994	12	Portugal	H+C	Não	15 anos	Espanha
TX21	M	45	1996	10	Portugal	H+C	Sim	26 anos	Não
TX22	F	30	1997	9	Portugal	H+C	Não	6 anos	Inglaterra
TX23	F	32	1998	8	Portugal	H+C	Não	7 anos	Não
TX27	M	41	1996	10	Portugal	H+C	Não	15 anos	Não
TX31	M	41	1994	12	Portugal	H+C	Não	7 anos	Não
TX32	F	41	1994	12	Portugal	H+C	Não	15 anos	Espanha
TX34	M	36	1995	11	Portugal	H+C	Não	15 anos	Inglaterra
TX40	M	30	1995	11	Portugal	H+C	Não	10 anos	Espanha, França
TX45	M	35	1998	8	Portugal	H	Não	15 anos	Não
TX48	M	35	1994	12	EUA	H+C	Sim	21 anos	EUA
TX49	M	51	1998	8	Portugal	H+C	Sim	6 anos	Não
TX50	M	37	1998	8	Portugal	H+C	Não	19 anos	Não
TX54	M	33	1998	8	Portugal	H+C	Não	4 anos	Angola
TX55	M	54	1997	9	Portugal	H+C	Sim	15 anos	Macau, HongKong, Tawan, Singapura
TX57	M	33	1994	12	Portugal	H	Sim	13 anos	Espanha
TX59	M	29	1995	11	Portugal	H+C	Sim	3 anos	Não
TX60	M	41	1996	10	Portugal	H+C	Não	21 anos	França
TX63	M	34	1997	9	Portugal	H+C	Sim	20 anos	Espanha

TX5 a TX70 - Grupo Infecções VIH-1 Recentes; TX7 a TX63 - Grupo Infecções VIH-1 Antigas; M - Masculino; F - Feminino; H - Heroína; C - Cocaína; NR - Não Respondeu